

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت دکترای تخصصی در رشته دستیاری زنان

عنوان

بررسی پلی مورفیسم 174(GC)- پروموتور ژن IL6 در بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک

اساتید راهنما

دکتر مهدی سهمانی

دکتر طلعت دباغ

استاد مشاور

دکتر فرشاد فروغی

دانشجو

دکتر باندرانی که عماری

بهار 1397

شماره پایان نامه:

سپاسگزاری می نمایم از استاد راهنمای گرانقدر خود
سرکار خانم دکتر دباغی
که با سعه صدر اینجانب را همراهی نمودند.

سپاسگزاری می نمایم از استاد راهنمای ارجمند
جناب آقای دکتر سهمانی
که در انجام این پایان نامه از حسن همکاری ایشان بهره بسیار بردم.

و از آقای دکتر فروغی سپاسگزارم
که زمان ارزشمند و دانسته های تخصصی خود را در اختیار اینجانب گذاشتند .

. صدها فرشته بوسه بر آن دست میزنند

کز کار خلق یک گره بسته وا کند

الهی مرا یاری ده که لایق پوشیدن لباسی با پاکترین رنگ دنیا باشم.

تقدیم به آنان که نامشان را از یاد نمیبرم

با تشکر و سپاس فراوان از کلیه اساتید گرانقدر گروه زنان دانشگاه علوم پزشکی قزوین که در طی سالهای تحصیل همواره با راهنمایی ها و آموزشهای بی دریغشان روشنی بخش راهم بوده اند.

سپاسگزاری می نمایم از اساتید راهنمای گرانقدر خود سرکار خانم دکتر دباغی و جناب آقای دکتر سهمانی که با سعه صدرو همراهی خالصانه و سخاوتمندانه شان پیمودن این مسیر را برایم هموار ساختند.

و سپاس فراوان از جناب آقای دکتر فروغی استاد راهنمای ارجمند

که زمان ارزشمند و دانسته های تخصصی خود را در اختیار اینجانب گذاشتند .

پروردگارا:

نمیتوانم موهای مادرم را که در راه عزت من سفید شد سیاه کنم .. پس توفیقم
ده که هر لحظه شکر گذار حضورش باشم ...

تقدیم به :

مادر فداکارم که عمری خستگی ها را بجان خریدتا اکنون توانست طعم خوش
پیروزی را به من بچشاند.

روح پاک پدر بزرگوارم

که از نگاهش صلابت اموختم و لحظات ناب خود باوری , لذت و غرور دانستن
, جسارت خواستن وعظمت رسیدنم را مدیون حضور سبزش هستم.

همسرم , همسفر زندگیم , که خوشبختی من پیدا کردن او از میان این همه
ضمیر بود.

یگانه دخترم ژالین , که با وجودش مرا لایق زیباترین احساس کرد . بهشت من
نفس های آرام کودکی اوست.

برادر, که طبابت را با هم آغاز کردیم در کنار هم اموختیم و به امید هم به آینده
چشم میدوزیم.

چکیده

زمینه و هدف: تاکنون علت مشخصی برای سندرم تخمدان پلی کیستیک معرفی نشده است، اما تحقیقات بسیاری، ارتباط بین مارکرهای ژنتیکی و بروز این سندرم را مورد بررسی قرار داده اند. سایتوکاین IL6 به نظر می رسد در فیزیولوژی باروری از جمله تنظیم تولید استروئیدها از تخمدان، بلوغ فولیکول ها و فرایندهای تخمک گذاری و Implantation در رحم تاثیر گذار باشد، (پارامترهایی که در بیماران PCOS تحت تاثیر قرار می گیرد.) این مطالعه در پی آن است که ارتباط بین پلی مورفیسم 174 (G/C) - ژن IL6 را در بیماران PCOS مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی، 152 بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک و 164 زن نابارور که هیچ علائم بالینی و آزمایشگاهی ذال بر سندرم تخمدان پلی کیستیک نداشتند در دو گروه مبتلا و غیر مبتلا تقسیم بندی شدند. مقدار 5 سی سی خون از هر یک از افراد مورد مطالعه جهت بررسی مشخصات بیوشیمیایی از جمله قند خون ناشتا، تری گلیسرید، اچ دی ال، ال دی ال، FSH، LH، تستسترون، استرادیول و قند خون دو ساعت بعد و همچنین نمونه های خون جهت ارزیابی ژنوتیپی و سنجش آلل ها جمع آوری شد. پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی 174 (G/C) - واقع در ناحیه پرموتوری ژن IL6 با استفاده از تکنیک های واکنش زنجیره ای پلی مرز و محدودیت طول قطعات پلی مورفیسم مورد بررسی قرار گرفتند. از SPSS v.24 برای آنالیز داده ها استفاده شد. سطح معنی داری، کمتر از 5 درصد در نظر گرفته شد.

یافته ها:

نتایج این مطالعه نشان داد که در متغیرهای BMI، کلسترول کل، و تری گلیسرید، LDL، 2HPP در دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به PCOS تفاوت معنادار داشته اند به طوریکه میزان BMI، LDL، TG، و سن در گروه بیمار بالاتر بود. همچنین نشان داده شد که میزان هورمون های تستسترون و استرادیول نیز در این گروه ها تفاوت معنادار داشته است. بطوریکه میزان تستسترون در گروه مورد بیشتر از گروه کنترل بوده است و در ارتباط با هورمون استرادیول این تفاوت برعکس بوده است. نتیجه بررسی میزان گلوکز پس از 2 ساعت نیز نشان داد که میزان آن در افراد مبتلا به PCOS به طور معناداری کمتر از گروه کنترل می باشد. در مورد کلسترول نیز این ارتباط معنی دار بود و در گروه بیمار میزان کلسترول پایینتر از گروه کنترل بود.

نتایج بررسی فراوانی ژنوتیپی حاصل از پلی مورفیسم (G/C) 174- در پروموتور ژن IL6 نیز نشان دهنده تفاوت معنادار این ژنوتیپ‌ها در گروه کنترل و مورد بود. بطوریکه فراوانی ژنوتیپ‌های CC,GG,GC در گروه کنترل به ترتیب برابر با 19/3%، 41/2%، و 39/5% بود و این فراوانی در گروه مبتلایان به PCOS به ترتیب برابر با 26/4%، 52/8%، و 20/8% به دست آمد. همچنین بررسی فراوانی هریک از ژنوتیپ‌های مذکور فارغ از گروه بندی کنترل و مورد نیز نشان داد که بین میزان فراوانی ژنوتیپ‌های GC و CC همچنین بین ژنوتیپ‌های CC و GG اختلاف معناداری وجود دارد.

از سوی دیگر میزان فراوانی متغیرهای دموگرافیک و بیوشیمیایی در برابر هر یک از ژنوتیپ‌ای اسنیپ (G/C) 174- در گروه کنترل و بیماران مبتلا به PCOS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که در گروه کنترل تنها سطح کلسترول کل با ژنوتیپ‌های CG، GG و CC در ارتباط بوده است. بر اساس این بررسی نشان داده شد بیشترین ($101/3 \pm 8/5$) و کمترین ($98/4 \pm 6/4$) سطح کلسترول گروه کنترل به ترتیب در افراد با ژنوتیپ GG و CC بوده است.

کلید واژه ها: سندرم تخمدان پلی کیستیک، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ژن IL6

1-1- بیان مساله و اهمیت پژوهش	2
1-2- سندرم تخمدان پلی کیستیک	5
1-2-1- تشخیص سندرم تخمدان پلی کیستیک	6
1-2-2- علائم و تظاهرات بالینی	8
1-2-3- اتیولوژی	9
1-2-4- درمان	10
IL6-1-3	14
Error! Bookmark not defined.	1-3-1
1-4- پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی	14
1-4-1- انواع چند ریختی نوکلئوتیدی	18
1-4-2- فراوانی اسنپ‌ها	19
1-4-2-1- فراوانی در ژنوم	19
1-4-3- اهمیت SNP ها	20
1-4-4- روشهای آنالیز SNP	22
1-5- اهداف	23

24.....	1-6- فرضیات
24.....	1-8- واژگان کلیدی
26.....	2-1- مروری بر مطالعات گذشته
30.....	3-1- نوع پژوهش
30.....	3-2- جامعه پژوهش
30.....	3-3- محیط پژوهش
30.....	3-4- نمونه پژوهش
30.....	3-5- روش نمونه گیری
30.....	3-6- حجم نمونه
31.....	3-7- معیارهای ورود به مطالعه
31.....	3-8- معیارهای خروج از مطالعه
32.....	3-9- ابزار گردآوری اطلاعات
32.....	3-10- روش کار
32.....	3-11- روش انجام آزمایش
52.....	3-12- تجزیه و تحلیل داده ها
53.....	3-13- ملاحظات اخلاقی

54.....	14-3- متغیرها
56.....	1-4- نتایج
61.....	1-5- بحث
Error! Bookmark not defined.	2-5- نتیجه گیری
66.....	3-5- پیشنهادات
67.....	منابع

فهرست جداول

جدول 3-1 مشخصات تنظیمات واکنش PCR مورد استفاده در این مطالعه.....41

جدول 3-2 حجم مورد نیاز و غلظت نهایی اجزا جهت تهیه مخلوط PCR.....43

جدول 3-3 حجم مورد نیاز و غلظت نهایی اجزا جهت تهیه مخلوط PCR.....44

جدول 3-4 درصد آگارز و قدرت تفکیک آن.....45

جدول 3-5 حجم مورد نیاز جهت تهیه مخلوط PCR-RFLP.....51

جدول 3-6 متغیرهای مورد بررسی در این مطالعه.....54

جدول 4-1 مقایسه خصوصیات دموگرافیک و بیوشیمیایی در دو گروه کنترل و مبتلا به PCOS مورد

مطالعه.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-2 مقایسه پراکندگی ژنوتیپی در پروموتور ژن IL6 منتج شده از پلی مورفیسم (G/C) 174- در

دو گروه مورد مطالعه.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-3 آنالیز Logistic regression بین ژنوتیپهای مختلف پروموتور ژن IL6 حاصل از پلی

مورفیسم (G/C) 174-.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-4 مقایسه پارامترهای دموگرافیک و بیوشیمیایی بین گروه های ژنوتیپی مرتبط با پلیمورفیسم -

174 (G/C) در گروه کنترل.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-5 مقایسه پارامترهای دموگرافیک و بیوشیمیایی بین گروه های ژنوتیپی مرتبط با پلیمورفیسم -

174 (G/C) در گروه کنترل.....**Error! Bookmark not defined.**

فهرست اشکال

- شکل 1-1 تخمدان پلی کیستیک 6
- شکل 1-2 پلیمورفیسم تک نوکلئوتیدی 18
- شکل 1-3 تقسیمبندی اسنپها بر اساس محل وقوع 19
- شکل 3-1 تصویر حاصل از ژل الکتروفورز محصول PCR 50

فصل اول

مقدمه

1-1- بیان مساله و اهمیت پژوهش

سندرم تخمدان پلی کیستیک¹ که در برخی موارد از آن به عنوان تنبلی تخمدان نیز یاد می‌شود از بیماری‌های شایع در زنان است و به دلیل عوارضی که می‌تواند داشته باشد از اهمیت بسیاری برخوردار است (1)، این سندرم اغلب با وجود سابقه در بستگان درجه یک و دو اتفاق می‌افتد و در واقع مجموعه‌ای از علائم است که می‌تواند همه این علائم در فردی ظاهر شود یا تنها برخی از آنها خود را نشان دهد (2). این سندرم از جمله اختلالات غدد درون ریز است که در سنین باروری زنان خود را نشان می‌دهد و مهمترین علت نازایی به دلیل عدم تخمک گذاری در آنان محسوب می‌شود (3) اختلالات غدد در خانم‌ها در سنین باروری و پس از سنین بلوغ آغاز می‌شود و بیشترین سن بروز آن 20 تا 40 سالگی است. میزان شیوع این سندرم در دنیا حدود 6-10 درصد می‌باشد (4).

این افراد به علت تخمک گذاری‌های کم، نامنظم و یا عدم تخمک گذاری به مدت طولانی، دچار قاعدگی‌های دیر به دیر و حتی گاهی هر چند ماه یک بار می‌شوند و به علت افزایش هورمون‌های مردانه مبتلا به رویش موهای زائد، آکنه و ریزش موی سر می‌گردند (5). بنابراین از جمله ویژگی‌های بالینی این سندرم می‌توان به اختلالات قاعدگی، پر موئی، آکنه، طاسی، ناباروری به همراه تغییرات هورمون‌های غدد درون ریز شامل افزایش سطح آندروژن، استروژن، پرولاکتین و کاهش میزان هورمون پروژسترون و اختلالات متابولیک مانند مقاومت به انسولین، چاقی، اختلالات مربوط به چربی خون و دیابت نوع 2 می‌باشد (6, 7). در بیشتر بیماران مبتلا، ممکن است تنها یک یا دو علامت بالینی وجود داشته باشد (4). زنان با سندرم تخمدان پلی کیستیک دارای علائم کلینیکی گسترده‌ای می‌باشند ولی معمولاً آن‌ها به علت سه اختلال به پزشک مراجعه می‌کنند که عبارتند از نامنظمی قاعدگی، نازایی و علائم همراه با افزایش آندروژن مثل

¹-PCOS;POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROM

هیرسوتیسم و آکنه می‌باشد (8). این سندرم به صورت معمول با وجود 2 علامت از 3 نشانه قاعدگی نامنظم، موهای زاید و بزرگی دو طرف تخمدان پر از فولیکول‌های ریز مشخص می‌شود و در واقع منظور از سیست تخمدان، فولیکول ریز حاوی 9-2 میلی‌متر مایع است که پایدار بوده ولی جز در موارد محدود و در حین نازایی، اصلاً نیاز به جراحی ندارد (9). اختلالات قاعدگی (سیکل‌های کمتر از 21 روز و یا بیش از 35 روز)، یکی از شایع‌ترین شکایات این افراد است و از طرفی یکی از شایع‌ترین علل بی‌نظمی قاعدگی نزد خانم‌ها در سنین باروری (بخصوص سنین 20 تا 40 سال) نیز همین سندرم است در واقع هر خانمی که با عادت ماهیانه نامنظم مراجعه نماید، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مطرح است مگر اینکه خلاف آن ثابت شود (5, 8). بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به علت عوامل خطری نظیر چاقی، هیپرانسولینمی، هیپراندروژنمی، مقاومت انسولینی و دیس‌لیپیدمی در معرض بیماری‌های دیگری از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی و ترومبوتیک قرار دارند (10). چاقی و خصوصاً چاقی شکمی در 3/2 مبتلایان به این سندرم دیده می‌شود و یافته علمی که اکثر مقالات به آن استناد می‌کنند این است که حتی در صورت 5 تا 10 درصد کاهش وزن احتمال از سرگیری تخمک‌گذاری و حتی بارداری خود به خودی وجود دارد (5, 8). طبق مطالعات، بارداری در وزن‌های بالا که با شاخص توده بدن¹ بیش از 30 تعریف می‌شود با عوارض نامطلوب مانند سقط و مسمومیت حاملگی و دیابت بارداری همراه است (11). دیگر عوارض این سندرم شامل عدم تخمک‌گذاری مرتب و بنابراین ایجاد اشکال در بارداری، خونریزی‌های نامنظم رحمی و در صورت عدم توجه و درمان، ضخامت غیرطبیعی مخاط رحم و حتی احتمال سرطان مخاط رحم در سنین بالاتر است (7). علاوه بر عوارض ذکر شده همچون خونریزی‌های غیرطبیعی و نامنظم رحم، ممکن است حتی پس از این که بارداری اتفاق افتاد، یک سری عوارض حاملگی زودرس همچون سقط و سقط مکرر و یا عوارض دیر رس بارداری همانند مسمومیت حاملگی، دیابت بارداری یا کاهش رشد داخل

¹ BMI: Body Mass Index

رحمی جنین ظاهر شوند (12). دیگر عوارض مهم آن مشکلات قلبی-عروقی، افزایش فشارخون، عدم تحمل قند، بروز دیابت تیپ دو، افزایش چربی خون، کبد چرب و کاهش سطح خونی ویتامین D3 است، احتمال بروز این عوارض با چاقی و سابقه فامیلی بالا می‌رود (7). بنابراین تمام مبتلایان به این سندرم از نظر خطر این عوارض در مراجعه به پزشکان بررسی شوند. این بررسی شامل اندازه گیری مرتب وزن، دورکمر، فشارخون، تست تحمل قند و چربی خون است. از دیگر عوارض مهم این سندرم، احتمال بروز افسردگی و اضطراب در اثر مشکلات مزمن و از دست دادن اعتماد به نفس به علت ظاهر فیزیکی است که متأسفانه فرد را از توجه به خود باز می‌دارد و لذا شخص در یک سیکل معیوب قرار می‌گیرید، بنابراین این افراد نیازمند توجهی خاص می‌باشند (13).

علی رغم تحقیقات گسترده‌ای که در دنیا بر روی این بیماری صورت گرفته، علت آن به دلیل پیچیدگی پاتوفیزیولوژی که همراه با اختلال عملکرد متابولیک در محور هیپوتالاموس، هیپوفیز و آدرنال است، هنوز ناشناخته می‌باشد (14). اگرچه یکی از علل مطرح آن، بالا بودن سطح انسولین خون است و در واقع یکی از مشکلات زیر بنایی موجود به همراه این سندرم وجود عدم تعادل هورمون در زنانی است که به سندرم تخمدان پلی کیستیک مبتلا هستند یعنی تخمدان‌ها در این افراد، استروژن و آندروژن یا به عبارتی هورمون-های مردانه بیش از حد طبیعی تولید می‌کنند (15). براساس تحقیقات اخیر، این سندرم زمینه چند عاملی دارد به این ترتیب که علاوه بر زمینه ارثی، عوامل محیطی هم در آن دخالت دارند (6, 16). یکی از مهمترین این عوامل سبک زندگی می‌باشد، که خود شامل عادات غذایی، میزان تحرک، استرس و سیکل خواب-بیداری در این افراد است (16). آنچه مسلم است پدیده چاقی، احتمال بروز آن را افزایش می‌دهد و البته که این سندرم نیز با چاقی به خصوص چربی شکم و احشایی همراه است (8).

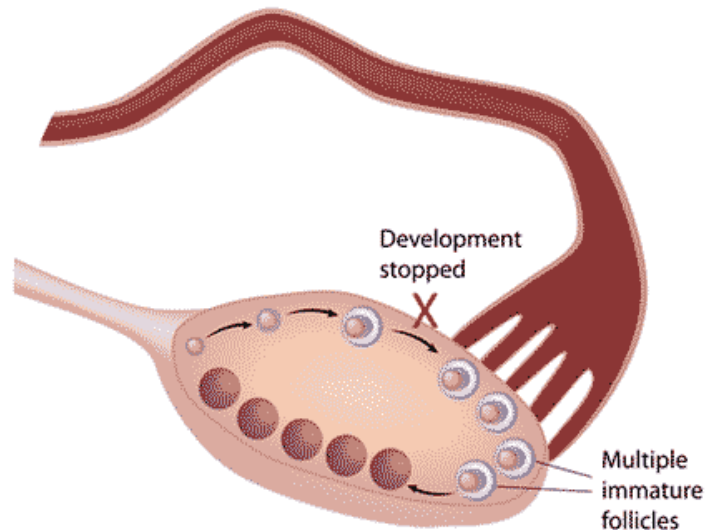
با توجه به کشف ارتباط بین سندرم تخمدان پلی کیستیک با ژنتیک، چاقی و متابولیسم آن، این موضوع با جزئیات عمیق‌تری مورد بررسی قرار گرفت (5, 8). در سال‌های اخیر برخی تحقیقات از نظر ژنتیک به سندرم تخمدان پلی کیستیک پرداخته و تاکنون چندین ژن از جمله ژن‌های بیوستت و متابولیسم استروژن، ژن‌های چاقی، تنظیم انرژی، ترشح و عملکرد انسولین آزمایش و مورد بررسی قرار گرفته‌اند (2, 6).

علی‌رغم تحقیقات گسترده‌ای که در دنیا روی این بیماری صورت گرفته، علت آن به دلیل پیچیدگی پاتوفیزیولوژی با اختلال عملکرد اندوکراین-متابولیک در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال هنوز ناشناخته می‌باشد. در سال‌های اخیر برخی تحقیقات از نظر ژنتیک به بیماری تخمدان پلی کیستیک پرداخته و تاکنون چندین ژن از جمله ژن‌های بیوستت و متابولیسم استروژن، ژن‌های چاقی، تنظیم انرژی، ترشح و عملکرد انسولین و همچنین اثرات سایتوکاین‌های التهابی، آزمایش و مورد بررسی قرار گرفته‌اند (6).

.....

2-1- سندرم تخمدان پلی کیستیک

سندرم تخمدان پلی کیستیک شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز در زنان و شایع‌ترین علت نازایی ناشی از عدم تخمک‌گذاری می‌باشد (1). نام گذاری این سندرم به دلیل وجود تخمدان‌های بزرگ محتوی تعداد زیادی کیست کوچک (در اغلب زنان مبتلا) است که در لایه بیرونی هر تخمدان قرار گرفته است (1) (شکل 1-1).



شکل 1-1 تخمدان پلی کیستیک

زنان مبتلا به این سندرم علائم شایعی مانند اختلالات قاعدگی (به خصوص ایگومنوره)، علائم هیپرآندروژنیسم مانند پر مویی (هیرسوتیسم) و آکنه، ریزش مو و نازایی دارند (4). بیماران در معرض عوارض جدی مانند افزایش خطر سرطان آندومتر و پستان، دیس لیپیدمی، افزایش فشارخون، بیماری‌های قلبی و عروقی و دیابت می‌باشند (32). شیوع چاقی و دیس لیپیدمی در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی-کیستیک بیشتر از زنان سالم می‌باشد. ۴۰ درصد زنان مبتلا، دچار چاقی مفرط و ۷۵ درصد آن‌ها نازا می‌باشند (3). این بیماری تقریباً در ۶ تا ۱۰ درصد همه زنانی که در سنین باروری می‌باشند دیده می‌شود. قاعدگی‌های نامنظم، رشد موهای زاید، جوش‌های پوستی (آکنه) و چاقی در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مشاهده می‌شود. این عارضه می‌تواند در نوجوانی با دوره‌های قاعدگی نامنظم مشخص گردد یا این که بعدها به دنبال افزایش وزن یا مشکل در باروری تشخیص داده شود (1, 3, 8).

1-2-1- تشخیص سندرم تخمدان پلی کیستیک

شواهد سونوگرافی تخمدان پلی‌کیستیک (افزایش حجم تخمدان به بیش از ۹ میلی لیتر، وجود کیست‌های ۲-۸ میلی‌متری به تعداد ۱۰ و یا بیشتر در هر تخمدان و افزایش دانسیته استرومای رحم (هایپرپلازی

آندومتر) هستند (33). اختلالات متابولیکی از جمله افزایش سطح سرمی هورمون‌های LH، تستوسترون، انسولین، پرولاکتین و مقاومت به انسولین در این بیماری شایع است (34, 35).

به طور کلی جهت تشخیص سندرم تخمدان پلی‌کیستیک فرد باید دو نشانه از نشانه‌های زیر را دارا باشد:

1. قاعدگی‌های نامنظم

این امر یکی از شایع‌ترین مشخصات این بیماری است. منظور از قاعدگی‌های غیر معمول، فاصله بیش از 35 روز بین دو قاعدگی، کمتر از 8 دوره قاعدگی در یک سال، عدم قاعدگی برای 4 ماه یا بیشتر و وقوع قاعدگی با تاخیر همراه با خونریزی خیلی کم یا شدید است.

2. افزایش آندروژن‌ها یا هورمون‌های مردانه

سطوح بالای هورمون‌های مردانه می‌تواند سبب ایجاد علائم ظاهری مثل رشد موهای زاید در صورت و بدن، ایجاد آکنه در بزرگسالی یا آکنه‌های شدید در نوجوانی و طاسی با الگوی مردانه شود. علائم ناشی از آندروژن بالا می‌تواند براساس نژاد فرد متفاوت باشد.

3. تخمدان‌های پلی‌کیستیک

سونوگرافی تخمدان‌های بزرگ حاوی تعداد زیادی کیست کوچک را مشخص می‌کند. اما برخلاف آن چه از نام آن پیداست، تنها با وجود تخمدان‌های پلی‌کیستیک نمی‌توان تشخیص قطعی داد.

برای تشخیص قطعی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک وجود دوره‌های قاعدگی نامنظم یا علائم ناشی از میزان آندروژن بالا نیز لازم است. ممکن است برخی از زنان با وجود تخمدان‌های پلی‌کیستیک در سونوگرافی به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مبتلا نباشند. از طرف دیگر نیز ممکن است در بعضی از افراد مبتلا به این سندرم، تخمدان‌ها در سونوگرافی طبیعی باشند (33, 36).

2-2-1- علائم و تظاهرات بالینی

مقاومت به انسولین، شروع هیرسوتیسم و چاقی در حوالی منارک، عدم تخمک گذاری به شکل متناوب همراه با افزایش تستوسترون و DHEA-S که در این طرح معیار اصلی برای سندرم تخمدان پلی کیستیک ذکر شده است، از جمله علائمی است که در این بیماران مشاهده می گردد (37). در آمریکا هیرسوتیسم تقریباً در 70 درصد از بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک رخ می دهد در صورتی که در ژاپنی ها 10 تا 20 درصد بیماران سندرم تخمدان پلی کیستیک هیرسوتیسم دارند که می تواند به خاطر تفاوت های ژنتیکی باشد (38). اختلال در عملکرد قاعدگی می تواند از الیگومنوریا تا آمنوریا متغیر باشد، که به عنوان یک قانون بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک دچار عدم تخمک گذاری هستند حتی در خانم هایی که دارای سیکل های مرتب هستند میزان عدم تخمک گذاری 20 درصد می باشد. حتی گفته می شود که آکنه شدید در سال های نوجوانی می تواند پیشگو کننده سندرم تخمدان پلی کیستیک در آینده باشد (3). بیش از نیمی از بیماران سندرم تخمدان پلی کیستیک چاق هستند که این چاقی خطر دیابت قندی و مشکلات قلبی و عروقی را زیاد می کند (38). مقاومت به انسولین و افزایش انسولین به طور شایعی در سندرم تخمدان پلی کیستیک وجود دارد که یک سوم بیماران چاق این سندرم دچار اختلال تحمل گلوکز و 10 تا 70 درصد دچار دیابت نوع II می شوند (35). در سندرم تخمدان پلی کیستیک اختلال در متابولیسم لیپوپروتئین ها وجود دارد که شامل افزایش در کلسترول، تری گلیسرید و LDL و کاهش HDL می باشد (1, 8). از دیگر اختلالات در این بیماری، اختلال در فیبرینولیزین است که باعث افزایش شیوع فشار خون می شود که این مورد در حوالی سنین یائسگی به 40 درصد رسیده و شیوع آترواسکلروز و بیماری قلبی عروقی را به 7 درصد می رساند (7, 39). از لحاظ پاتولوژی ظاهری اندازه تخمدان ها به 2/5 برابر طبیعی می رسد و دارای کیست های متعددی می شود که عموماً قطر کمتر از یک سانتی متر دارند (4).

3-2-1- اتیولوژی

علت سندرم تخمدان پلی کیستیک ناشناخته است ولی می تواند نتیجه ای از فاکتورهای ژنتیکی پیچیده ای باشد که اغلب در شروع بلوغ خود را نشان داده و فاکتورهای ارثی و غیر ارثی می تواند باعث بروز فنوتیپی سندرم تخمدان پلی کیستیک شود (6, 40). بیماران مبتلا به این سندرم با ظاهری نرمال و نمای تخمدان پلی کیستیک در سونوگرافی حامل تحت بالینی می باشند، سندرم تخمدان پلی کیستیک ظاهرا یک اتوزوم غالب ارثی بوده بیشتر بیماران مبتلا به این سندرم با تخمدان پلی کیستیک معمولا یا مادری مبتلا دارند که بدون علامت است یا دارای پدری با سندرم متابولیک می باشند که نتیجه آن فتوتیپ سندرم تخمدان پلی- کیستیک، عدم تخمک گذاری در دختر می باشد (2, 32, 33). تقریبا نیمی از خواهران فرد مبتلا به این سندرم دارای افزایش هورمون توستوسترون هستند و تنها نیمی از این خواهران دارای افزایش توستوسترون دارای اختلال در قاعدگی هستند و نیمی دیگر بدون علامت هستند (41, 42). پاتوفیزیولوژی و یافته های آزمایشگاهی هایپرآندروژنیسم و عدم تخمک گذاری در سندرم تخمدان پلی کیستیک ممکن است در اثر ناهنجاری هایی در چهار بخش که از نظر اندوکرینولوژیک فعال هستند رخ دهد؛ این بخش ها عبارتند از: تخمدان ها، بافت های چربی، غده فوق کلیه، بخش هیپوتالاموس و هیپوفیز (4).

غده فوق کلیه نیز در پیدایش این سندرم نقش دارد، میزان DHEA-S در 50 درصد این بیماران افزایش می یابد و بخش محیطی که شامل پوست و چربی می باشد دخالت خود را در این سندرم به طرق زیر نشان می دهد:

1. وجود یا فقدان فعالیت آنزیم ردوکتاز در پوست بروز یا عدم بروز هیرسوتیزم را تعیین می کند.

2. افزایش فعالیت آنزیم آروماتاز در سلول های چربی باعث افزایش وزن بدن می شود.

3. کاهش متابولیسم استروژن‌ها بخش هیپوتالاموس-هیپوفیز در پیدایش سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌تواند باعث افزایش LH شده و همین طور افزایش نسبت LH/FSH و این باعث افزایش مزمن غلظت استروژن در بدن می‌شود. در 25 موارد نیز در بیماران افزایش پرولاکتین گزارش شده است. از نظر بالینی این نکته اهمیت دارد که بیماران مبتلا به این سندرم در اوایل زندگی خود در معرض خطر زیادی برای ابتلا به عدم تحمل گلوکز یا دیابت شیرین قرار دارند بنابراین غربال کردن منظم زنان چاق مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک از نظر عدم تحمل به گلوکز به دفعات 1 تا 2 بار در سال پیشنهاد می‌شود و متابولیسم غیرطبیعی گلوکز با کاهش وزن بهبود می‌یابد و ممکن است هایپراندرونیسم کاهش یابد و عملکرد تخمدان را حفظ کند (4, 32, 34, 35, 38).

زنان مبتلا ممکن است به دلیل مشکلات بوجود آمده در تخمک گذاری، برای باردار شدن با مشکل مواجه شوند (5). تشخیص زود هنگام و شروع درمان می‌تواند به پیشگیری عوارض طولانی مدت آن مثل دیابت نوع ۲، بیماری‌های قلبی و سکته کمک کند (43, 44).

4-2-1- درمان

درمان سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بستگی به بیمار دارد، بعضی از بیماران نیاز به داروهای ضد بارداری خوراکی دارند در حالی که سایر بیماران از القای تخمک گذاری استفاده می‌کنند. درمان پایدار هایپراندرونیسم و هیرسوتیسم را می‌توان همزمان انجام داد (45). با این حال در بیمارانی که تمایل به بارداری دارند کنترل هیرسوتیسم ممکن است امکان پذیر نباشد. انواع روش‌های درمانی به شکل زیر می‌باشد:

دارو درمانی:

1. کاهش وزن: در بیماران چاق اولین توصیه است؛ به طوری که کاهش وزن در طی دوره 6 ماهه به طور چشمگیری سبب کاهش تستوسترون می شود و در 75 درصد خانم ها سبب از سر گرفته شدن تخمک گذاری می گردد.
2. قرص های ضد بارداری خوراکی: این قرص ها از تولید استروئید در تخمدان و غده فوق کلیه می - کاهند و در دو سوم بیماران، هیرسوتیسم را کاهش می دهد امروزه انواعی از قرص های جلوگیری از حاملگی که حاوی پروژستین های جدید هستند (مانند دژوسترون و دروسپیرونون) فعالیت آندروژن ها را به حداقل می رسانند. استفاده از کنتراستپتو به تنهایی در درمان هیرسوتیسم در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک ممکن است غیر موثر باشد (کمتر از 10 درصد) در این بیماران مقاومت به انسولین نیز به علت استفاده از این داروها تشدید می گردد.
3. دپومدروکسی پروژسترون و یا مدروکسی پروژسترون استات: این دارو به طور موفقیت آمیزی برای درمان هیرسوتیسم مورد استفاده قرار می گیرد که 150 میلی گرم هر سه ماه دپومدورکسی پروژسترون و یا 40-20 میلی گرم مدروکسی پروژسترون استات خوراکی 95 درصد باعث کاهش رشد مو می شود.
4. آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین: تولید استروئید را از تخمدان سرکوب می کند لوپرولید استات عضلانی هر 28 روز هیرسوتیسم را درمان می کند اضافه کردن کنتراستپتو یا استروژن به هورمون آزاد کننده گنادوتروپین مانع تحلیل رفتن استخوان و سایر عوارض گر گرفتگی و آتروفی دستگاه تناسلی می شود.
5. دگزامتازون: برای درمان بیمارانی که دچار هایپروآندروژنیسم فوق کلیوی یا مخلوطی از آن با تخمدان هستند استفاده می شود.

6. کتوکونازول: این دارو با دوز پایین 200 میلی گرم در روز غلظت آندروستندیون و تستوسترون آزاد را کم می کند.

7. اسپرونولاکتون: نوعی دیورتیک حفظ کننده پتاسیم است اگرچه باعث کاهش تستوسترون و آزاد کل می شود. سرعت رشد خطی روزانه موهای جنسی و قطر تنه را کاهش می دهد. 25-100 میلی گرم دو بار در روز حداکثر تأثیر را دارد در فاصله 3-6 ماه، 9-12 ماه بعد از اسپرونولاکتون می توان الکترولیز کرد. شایع ترین عارضه، بی نظمی قاعدگی است که در 50 درصد بیماران با دوز 200 میلی گرم دیده می شود.

8. سیپروترون استات: دارای خاصیت آنتی آندروژن قوی است که در موارد شدید هیرسوتیسم و آکنه استفاده می شود. استفاده همزمان این دارو با استروژن مؤثرتر است.

9. متفورمین (گلوکوفاز): که با استفاده از دوز 500 میلی گرم سه بار در روز هیپراندریژنیسم را به نحو چشمگیری بهبود می دهد. الکترولیز و لیزر تنها روش دائمی در از بین بردن موهای زائد می باشد (7, 41, 45)

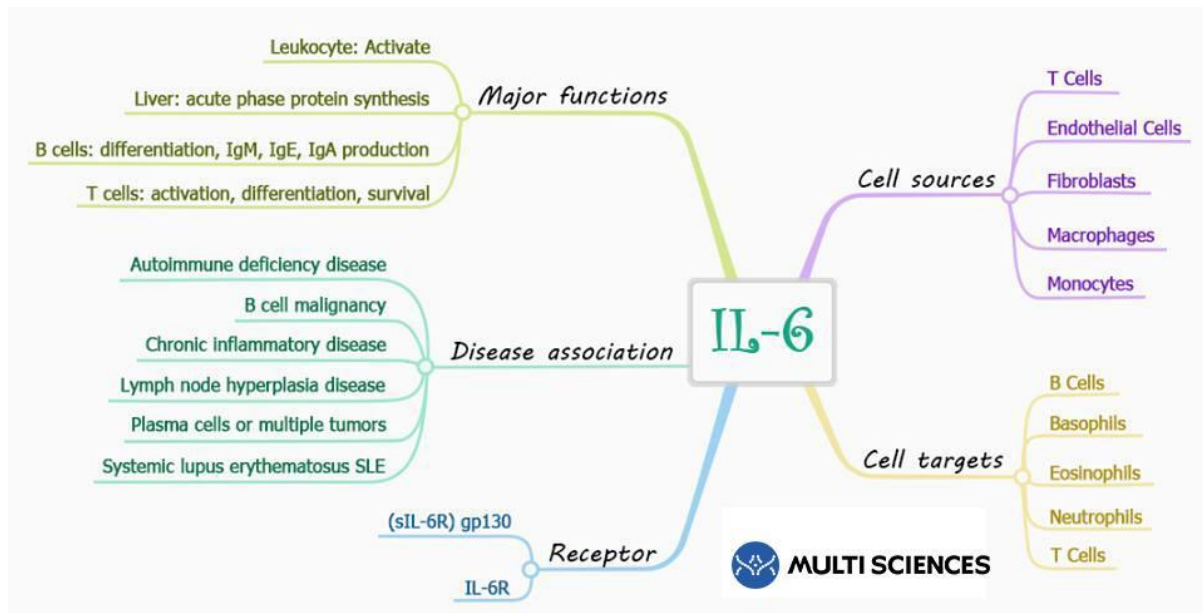
جراحی:

در صورت عدم پاسخ بیمار به دارو درمانی، جراحی بر روی تخمدان به وسیله لاپاروسکوپی می تواند یک گزینه درمانی دیگر برای برخی از بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک باشد. استفاده از ریسکشن گوه ای و یا الکتروکوتری تخمدان با لاپاراسکوپ که در بیماران مقاوم به کلویید (کلومیفن) برای درمان نازایی استفاده می شود که با استفاده از سوزن های 8 میلی متری 15-10 منفذ در تخمدان ایجاد می شود، پس از این جراحی در 73 درصد بیماران تخمک گذاری خود به خود رخ می دهد. در این عمل، جراح یک شکاف کوچک بر روی شکم ایجاد کرده و از این طریق یک لوله که متصل به یک لاپاراسکوپ است را

وارد می‌کند. این دوربین تصاویر لازم از تخمدان های بیمار و اعضای تناسلی مجاور را برای جراح مشخص می‌کند. سپس پزشک وسیله جراحی را وارد کرده و از انرژی الکتریکی یا لیزر برای سوزاندن سوراخ های موجود در فولیکول روی سطوح تخمدان ها استفاده می‌کند. هدف این کار تحریک تخمک گذاری به وسیله کاهش سطح آندروژن هاست (1, 3, 8, 32).

3-1- اینترلوکین 6 (Interleukin 6)

اینترلوکین 6 یکی از اینترلوکین‌های مهم بدن است که از گلبولهای سفید ترشح می‌شود و در پاسخهای التهابی و ایمنی نقش دارد. اینترلوکین شش از سلولهای درشت‌خوار، لنفوسیت تی کمک‌کننده، لنفوسیت‌های بی و آستروسیت ترشح می‌شود و بر سلولهای پلاسماسل و لنفوسیت مؤثر است. اصلیت‌ترین کارکرد این اسایتوکین تمایز سریع‌تر پلاسماسل‌ها و تولید بیشتر پادتن است میوکینها باعث تسهیل چند پاسخ سلولی به ورزش مانند سرکوب پروتئولیزی، آنژیوژنز و تنظیم گلیکوژن عضلانی می‌شوند • در این میان، اینترلوکین-6 توجه زیادی را به خود جلب کرده است، زیرا 1. از یک سو در دوره ی پس از ورزش یعنی هنگام افزایش عملکرد انسولین رها می‌شود 2. با چاقی و کاهش عملکرد انسولین نیز رابطه دارد. از طرف دیگر اینترلوکین-6 در هردو سیستم ایمنی نقش دارد • سیستم ایمنی ذاتی: تولید پروتئین های فاز حاد را توسط سلول های کبدی تحریک می‌کند و در ایجاد اثر سیستمی التهاب که فاز حاد نامیده می‌شود، شرکت می‌کند • سیستم ایمنی اکتسابی: رشد لنفوسیت های B را تحریک می‌کند که به سلول های تولیدکننده آنتی بادی تمایز می‌یابند. نکته • غلظت عمومی IL-6 در افراد چاق و بیماران دیابتی نوع 2 افزایش می‌یابد IL-6. به دلیل ماهیت گیرنده های خود اثر متفاوتی در انواع سلول ها دارد. در بیشتر سلول ها نقش پیش التهابی از خود نشان می‌دهد، اما در بعضی از بافت ها ممکن است موجب اختلال در عملکرد-TNF α شود. اینترلوکین - 6 یک سیتوکین اسپکتیو چند منظوره است که رشد و تمایز بافت های مختلف را تنظیم می‌کند که مخصوصا نقش آن در واکنش های ایمنی و واکنش فاز حاد شناخته شده است. در خون سازی، متابولیسم استخوان و پیشرفت سرطان دخیل است و نقش مهمی در هدایت انتقال از ایمنی ذاتی به اکتسابی دارد.



اینترلوکین 6 (IL-6) یک اینترلوکین است که به عنوان یک سیتوکین پرولاپلاسمی و یک میوکین ضد التهابی عمل میکند. و توسط سلول های T و ماکروفاژ ها برای تحریک پاسخ ایمنی، به عنوان مثال در طی عفونت و پس از ضربه، به ویژه سوختگی یا دیگر آسیب های بافت منجر به التهاب، ترشح می شود. IL-6 نیز نقش مهمی در مبارزه با عفونت دارد، زیرا IL-6 در موشهای مورد نیاز برای مقاومت در برابر باکتری *Streptococcus pneumoniae* نشان داده شده است.

IL-6 فاکتورهای التهابی و سیستم ایمنی بدن را در بسیاری از بیماری های نظیر دیابت، آترواسکلروز، افسردگی، بیماری آلزایمر، لوپوس اریتماتو سیستمیک، مولتیپل میلوما، سرطان پروستات، بیماری بهشت و آرتریت روماتوئید تحریک می کند. بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته / متاستاز سطوح بالاتری از IL-6 را در خون خود دارند .

سایتوکاین IL-6 به نظر میرسد در فیزیولوژی باروری از جمله تنظیم تولید استروئیدها از تخمدان ، بلوغ فولیکولها و فرایندهای تخمک گذاری و Implantation در رحم تاثیر گذار باشد ، پارامترهایی که در بیماری

pco تحت تاثیر قرار می گیرد.(10-11) ژن IL-6 انسانی روی کروموزوم 7 قرار گرفته و دارای ناحیه پروموتر 303 جفت بازی می باشد. پلی مورفیسم در ناحیه 174-در پروموتر ژن IL-6 در میزان نسخه برداری از ژن مذکور تاثیرگذار می باشد. (12) Erdogan و همکاران در سال 2008 ارتباط پلی مورفیسم IL-6 (G/C)-174 با مارکهای استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار دادند. ژنوتیپ IL-6 بین گروه کنترل و گروه PCO متفاوت بود. همچنین فراوانی آلل G پلی مورف تفاوت معنی داری بین دو گروه داشت. (13) در سال 2004 Walch و همکاران نشان دادند که پلی مورفیسم IL-6، تظاهرات بالینی بیماران PCO را تحت تاثیر قرار می دهد. (14) Vural و همکاران در سال 2010 پلی مورفیسم TNF α (-308)، (-1082) IL-10 و IL-6 (-174) در بیماران PCO را مورد آنالیز قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ CC و آلل C ژن IL-6 در بیماران PCO فراوانی پایین تری نسبت گروه کنترل داشت. (15) نتایج مطالعه Tumu و همکاران در سال 2013 نشان داد که ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم IL-6 (-174) و ریسک ابتلا به PCO در زنان جنوب هند وجود داشت. همچنین فراوانی آلل G در گروه PCO نسبت به گروه کنترل بالاتر بود.(16) این مطالعه در پی آن است که ارتباط بین پلی مورفیسم IL-6 (G/C)-174 ژن IL-6 و سطح سرمی آن را در بیماران PCO و گروه کنترل مورد بررسی قرار دهد.

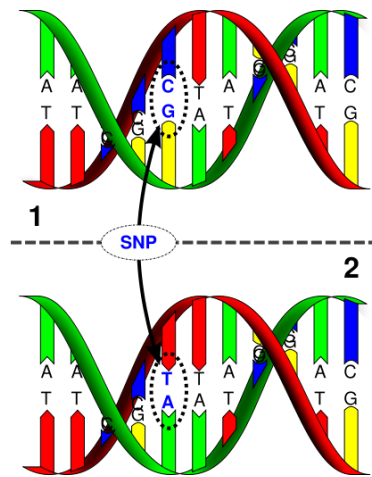
4-1- پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی¹ یا اسنپ جابجایی ثابت یک باز تک است (شکل 1-2) که فراوانی بیش از 1٪ در یک جمعیت داشته باشد. SNPها در سرتاسر ژنوم انسانی گسترش یافته‌اند. در سطح کروموزومی (بجز در سطح کروموزوم‌های جنسی) دانسیته SNP به طور نسبی در طول ژنوم ثابت است. SNP می‌تواند منجر به تغییر کاراکتر یا بیان یک ژن شود. البته اکثر SNPها تغییری در فنوتیپ ایجاد نمی‌کنند. اگر SNP در ناحیه مهم یک ژن باشد می‌تواند در بروز ژن تأثیر گذار باشد. به عنوان مثال SNPهایی که در ناحیه پروموتور سیتوکین‌هایی نظیر IL10, IL6, IL4, TNF می‌باشند مرتبط با اختلالات عفونی و خود ایمنی می‌باشند که قدرت تطابق میزبان هم در ایجاد این دامنه متغیر علائم، مؤثر است.

تفسیر عملکرد SNP عملکردی باید در هر جمعیت تحت شرایط محیطی خاص صورت گیرد چرا که یک SNP ممکن است برای دو جمعیت متفاوت مضر یا مفید باشد. برای مثال تغییر نوکلئوتید A به T در زنجیره β هموگلوبین منجر به ایجاد موتاسیون سلول داسی² می‌شود در حالیکه در مالاریای آندمیک افراد هتروزیگوت دارای این موتاسیون به بیماری مقاوم می‌باشند. که این مفید بودن فقط در این جمعیت خاص مشاهده می‌شود (51).

¹ Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

² Sickle cell



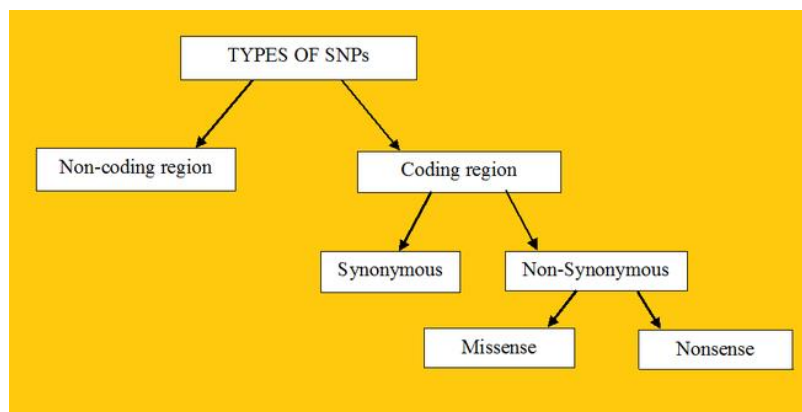
شکل 1-2 پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

بین جمعیت انسان‌ها تفاوت‌های گوناگونی است، بنابراین فراوانی یک اسنپ در یک منطقه جغرافیایی با یک نژادی خاص با فراوانی همان اسنپ در جمعیت دیگر تفاوت داشته باشد (52).

1-4-1- انواع چند ریختی نوکلئوتیدی

اسنپ‌ها ممکن است در نواحی مختلفی که کد کننده یا غیر کد کننده باشند از جمله نواحی کد کننده ژن، نواحی غیر کد کننده ژن، و مناطق بین ژنی مشاهده شوند. اسنپ‌های موجود در مناطق کد کننده با توجه به codon degeneracy الزما باعث تغییر در آمینواسید پروتئین هدف نمی‌شوند.

اسنپ‌ها در نواحی کد کننده ژن خود به دو دسته اسنپ مترادف و اسنپ غیر مترادف تقسیم بندی می‌شوند. اسنپ‌های مترادف هیچ گونه تاثیری بر توالی پروتئینی کد شده نخواهند داشت و این در حالی است که اسنپ‌های غیر مترادف باعث تغییر آمینواسید در توالی پروتئینی کد شده می‌شوند که خود به دو دسته missence و nonsense تفکیک می‌شوند. (شکل 1-3)



شکل 1-3 تقسیم‌بندی اسنپ‌ها بر اساس محل وقوع

اسنپ‌های موجود در مناطق غیر کد کننده پروتئینی همچنان می‌توانند بر فرایندهای مانند پیرایش ژنی، اتصال فاکتور رونویسی، تخریب mRNA و تغییر دنباله‌های غیر کد کننده پروتئینی شوند. اسنپ‌هایی که بیان ژنی را تحت تاثیر قرار می‌دهند را به عنوان eSNP (expression SNP) شناخته می‌شوند که این چند شکلی می‌تواند در منطقه بالا دستی یا پایین دستی ژن قرار داشته باشد (53).

1-4-2- فراوانی اسنپ‌ها

فراوانی SNPها را می‌توان در دو جمعیت هدف مورد بررسی قرار داد که شامل فراوانی در ژنوم و فراوانی در جمعیت می‌باشد.

1-4-2-1- فراوانی در ژنوم

توزیع ژنومی SNPها همواره همگن نمی‌باشد، به شکلی که فراوانی آن‌ها در مناطق غیر کد کننده به مراتب بیشتر از نواحی کد کننده ژنی می‌باشد. به طور عمومی می‌توان بیان کرد که انتخاب طبیعی با هدف تنظیم آلل‌ها تنها باعث باقی ماندن اسنپ‌هایی که بیشترین انطباق ژنتیکی مطلوب را دارند عمل می‌کند. دیگر فاکتورها مانند نرخ نوترکیبی و جهش نیز می‌تواند تراکم اسنپ‌ها را تعیین کند. همچنین تراکم اسنپ‌ها را

می‌توان با توجه به حضور میکروستلایت‌ها نیز پیش بینی کرد. از میکروستلایت‌ها AT به عنوان پیش‌بینی کننده قوی تراکم اسنپ‌ها استفاده می‌شود (54).

• فراوانی در جمعیت:

واضح است که تفاوت‌های زیادی در جمعیت‌های انسانی وجود دارد، بنابراین یک آلل SNP که در یک گروه جغرافیایی یا قومی معمول می‌باشد ممکن است در گروه دیگر بسیار نادر باشد. در یک جمعیت، می‌تواند به عنوان فرکانس آلل جزئی شناخته شود (55).

3-4-1- اهمیت SNP‌ها

تغییرات و تفاوت‌ها در توالی DNA انسانی می‌تواند بر چگونگی توسعه بیماری و پاسخ به پاتوژن‌ها، مواد شیمیایی، داروها، واکسن‌ها و دیگر عوامل تاثیرگذار باشد. همچنین SNP‌ها در پزشکی شخصی شده دارای اهمیت فراوان هستند.

➤ تحقیقات زیست پزشکی

بیشترین اهمیت SNP‌ها در تحقیقات زیست پزشکی برای مقایسه مناطقی از ژنوم بین گروه‌ها (مانند گروه‌های همسان با و بدون بیماری) در مطالعات گسترده ژنومی می‌باشد. SNP‌ها در مطالعات ژنومی به عنوان نشانگر با وضوح بالا در نقشه برداری ژن مربوط به بیماری و یا صفات طبیعی استفاده شده است. SNP‌ها بدون تاثیر قابل مشاهده بر روی فنوتیپ (بنابراین جهش خاموش نامیده می‌شود) هنوز هم به عنوان نشانگرهای ژنتیکی در مطالعات ژنومی، به دلیل مقدار آنها و توارث پایدار بین نسل‌ها مفید هستند (56).

➤ پزشکی قانونی

SNP در ابتدا برای تطبیق یک نمونه DNA پزشکی قانونی به یک مظنون مورد استفاده قرار گرفت اما با توسعه روش انگشت نگاری DNA وابسته به STR کمتر مورد توجه قرار گرفت. در آینده ممکن است SNP در پزشکی قانونی برای برخی سرنخ‌های فنوتیپی مانند رنگ چشم، رنگ مو، قومیت و غیره استفاده شود. Kidd همکاران نشان داده است که یک پانل از 19 SNP می‌تواند با احتمال خوبی گروه یا قومیت را در 40 گروه جامعه باز شناسایی کند (57).

➤ فارماکوژنتیک

دانش در ارتباط با SNP می‌تواند در درک فارماکوکینتیک و یا فارماکودینامیک کمک کننده باشد، به عنوان مثال چگونه مواد مخدر در افراد مبتلا به انواع مختلف ژنتیکی عمل می‌کنند. بیماری‌ها با SNP‌های مختلف ممکن است به هدف فارماکوژنتیک در ارتباط با درمان بیماری‌ها گردد. برخی SNP‌ها با متابولیسم داروهای مختلف در ارتباط می‌باشند (58).

➤ بیماری‌ها

یک اسنپ به تنهایی ممکن است باعث یک بیماری با الگوی توارثی مندلی شود. این در حالی است که برای بیماری‌ها با عامل پیچیده، یک اسنپ به تنهایی درگیر نبوده و با کنار هم قرار گرفتن با دیگر اسنپ‌ها شرایط بیماری آشکار می‌شود که برای نمونه می‌توان به بیماری پوکی استخوان اشاره کرد.

تمامی انواع SNP‌ها می‌توانند دارای فنوتیپ قابل مشاهده و یا تاثیری بر بیماری داشته باشند:

- اسنپ‌ها در نواحی غیر کد کننده: این نوع از SNP‌ها می‌توانند باعث آشکار شدن سرطان با ریسک بالا گردند و یا بر ساختار mRNA و استعداد در ابتلا به بیماری نقش داشته باشند.
- اسنپ‌ها در نواحی کد کننده: این نوع از SNP‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند.

1. جایگزینی مترادف: این تغییر تغییری را در آمینواسید پروتئین ایجاد نمی‌کند، اما همچنان می‌تواند از

طرق دیگر باعث تاثیر بر عملکرد باشد. برای نمونه، جهش خاموش در ژن مقاومت چند دارویی 1

(MDR1) که کد کننده پروتئینی غشایی با وظیفه خارج کردن داروها از سلول می‌باشد، باعث

کاهش سرعت ترجمه شده که در اثر آن به توالی پپتیدی اجازه داده می‌شود که کونفورماسیون غیر

معمول به خود بگیرد که در نتیجه آن پمپ جهش یافته عملکرد کمتری خواهد داشت.

2. جایگزینی غیر مترادف: بر اساس تقسیم‌بندی‌های رایج اینگونه جهش‌ها به دو دسته تقسیم می-

شوند.

الف) جهش نقطه‌ای بدمعنی: این جهش، تغییر در یک باز می‌باشد که باعث تغییر آمینواسید و در نتیجه آن

تخریب عملکرد پروتئین و ایجاد بیماری می‌شود. به عنوان مثال در ژن LMNA در جایگاه نوکلئوتیدی

1580 توالی CGT به CTT تغییر کرده که در سطح پروتئینی باعث جایگزینی لوسین به جای آرژنین در

جایگاه 527 آمینو اسیدی می‌شود. این SNP باعث بروز تداخل mandibuloacral dysplasia و سندروم

پیری زودرس می‌شود.

ب) جهش نقطه‌ای بی‌معنی: این جهش نقطه‌ای در توالی DNA می‌تواند باعث ایجاد یک کدون پایان نابجا،

یا کدون بی‌معنی در فرایند رونویس mRNA شود که نهایتاً منجر به تولید پروتئین غیر فعال می‌گردد. به

عنوان مثال بیماری سیستیک فیبروزیس به دلیل اسنپ G542X در ژن CFTR ایجاد می‌شود (59).

4-4-1- روش‌های آنالیز SNP

از آنجا که اسنپ‌ها معمولاً biallelic هستند معمولاً به راحتی مورد سنجش قرار می‌گیرند (59). روش‌های

آنالیز SNP با هدف کشف اسنپ جدید و یا شناسایی اسنپ شناخته شده شامل موارد زیر می‌باشند.

❖ DNA sequencing

- ❖ Capillary electrophoresis
- ❖ Mass spectrometry
- ❖ Single-strand conformation polymorphism (SSCP)
- ❖ Single-base extension
- ❖ Electrochemical analysis
- ❖ Denaturing HPLC and gel electrophoresis
- ❖ Restriction fragment length polymorphism
- ❖ Hybridization analysis

5-1- اهداف

طی این مطالعه اهداف گوناگونی مورد نظر قرار گرفته است که آن‌ها در سه گروه اهداف اصلی، فرعی و کاربردی تقسیم شده‌اند که در ذیل به آن‌ها اشاره خواهد شد.

الف-هدف اصلی طرح

بررسی رابطه پلی مورفیسم (G/C) 174- ژن IL6 در بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک

ب-اهداف فرعی

اهداف فرعی این طرح تحقیقاتی شامل موارد زیر بوده است.

1. تعیین توزیع فراوانی پلی مورفیسم (G/C) 174- ژن IL6 در بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی -

کیستیک

2. تعیین توزیع فراوانی پلی مورفیسم (G/C) 174- ژن IL6 در افراد سالم

3. مقایسه فراوانی پلی مورفیسم (G/C) 174- ژن IL6 در بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک

و افراد سالم

ج- اهداف کاربردی

شناسایی افراد پرخطر از نظر ابتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک بر اساس زمینه ژنتیکی

6-1- فرضیات

- توزیع فراوانی پلی مورفیسم (T/C) 174- ژن IL6 در بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک با افراد سالم متفاوت است.
- شدت پاتولوژیک بیماری PCOS با ژنوتیپ‌های مورد بررسی ارتباط دارد.

8-1- واژگان کلیدی

سندرم تخمدان پلی کیستیک

سندرم تخمدان پلی کیستیک شایع ترین اختلال هورمونی در میان زنان در سنین باروری است. جهت تشخیص این سندرم از معیارهای متفاوتی از جمله قاعدگی‌های نامنظم، افزایش آندروژن‌ها، و تخمدان‌های پلی کیستیک می‌باشد.

پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

پلی مورفیسم یا چند ریختی نوکلئوتیدی یک تغییر در دنباله DNA است که در یک نوکلئوتید G,T,A,C در ژنوم بین افراد یک گونه بیولوژیکی یا بین یک جفت کروموزوم در یک فرد اتفاق می‌افتد.

فصل دوم

مروری بر مطالعات گذشته

1-2- مروری بر مطالعات گذشته

IL-6 و IL-8 توسط بسیاری از سلولها، از جمله آدیپوسیت، ترشح می شوند. مانند $TNF-\alpha$ ، IL-6 و IL-8 همچنین می تواند در تنظیم مهاری مقادیر تری گلیسیرید نقش داشته باشد. IL-6 و IL-8 با هورمون لپتین مرتبط بوده و مطالعات نشان داده اند که سطوح IL-6 و IL-8 در افراد مبتلا به PCOS چاق و افراد مبتلا به PCOS کم وزن در مقایسه با زنان دارای وزن طبیعی افزایش یافته است.

علاوه بر سیتوکین ها، پارامترهای بیوشیمیایی مربوط به مشخصات لیپید و تری گلیسیرید ها در افراد مبتلا به PCOS مبتلا به چاق بررسی شده است. بنابراین کاهش سطح HDL -کلسترول به دست آمده از افراد مبتلا به PCOS چاق نشان دهنده ریسک قلبی عروقی است که بخشی از نتیجه دیس لیپیدمی می باشد.

ارتباط بین سرم IL-6، IL-8 و لپتین بسیار قوی است و همبستگی بسیار مهم و تفاوت 90 برابر بین مقاومت بیشتر لپتین و مقاومت بیشتر انسولین در مبتلایان به PCOS کم وزن، چاق و مکرر چاق PCOS و افراد غیر PCOS وجود دارد. بنابراین، می توان گفت $TNF-\alpha$ ، IL-6 و IL-8 هم با چاقی و هم با مقاومت به انسولین ارتباط داشتند؛

مطالعه Fulgesu و همکاران نشان می دهد که حضور تعدادی از عوامل متابولیکی و التهابی در دختران مبتلا به PCOS مقاوم به انسولین با یک پاسخ ایمنی تغییر یافته به محرک های میکروبی همراه است که موجب افزایش سطح سرمی IL-6 می شود. نتیجه گیری که از این مطالعه بدست آمدنشان داد که سطح سرمی IL-6 و ترشح بیشتر آن در مونوسیت های فعال LPS میزان مقاومت انسولینی (IR) را افزایش داد، در حالیکه در مورد سایر سیتوکین های التهابی تفاوت معنی داری وجود نداشت. این نتایج نشان می دهد که در بیماران مبتلا به PCOS واکنش ایمنی تغییر یافته به محرک های التهابی در IR وجود دارد که احتمالاً موجب ایجاد التهاب کم می شود.

نتایج بدست آمده در تحقیق Madianos نشان می دهد که عوامل هورمونی و متابولیکی در افراد مبتلا به PCOS به شدت در ارتباط با مقاومت به انسولین هستند و ممکن است برای تعیین وضعیت التهاب کم، منجر به تولید پروتئین مونوسیت های IL-6 در افراد مبتلا به PCOS به دنبال محرک التهابی میکروبی می گردد. با توجه به شواهد اخیر می توان عفونت را به عنوان عوامل خطر جدید آترواسکلروتیک مورد توجه قرار داد.

تعداد روزافزون مطالعات نشان داده است که بسیاری از عوامل ژنتیکی مانند تغییرات ژنتیکی در بیان ژنهایی از قبیل پاراکسوناز 1، متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR)، آدیپونکتین، اینترلوکین- (IL) 1A و IL-6 نقش مهمی در خطر PCOS دارند.

در مطالعه ای که در سال 2017 توسط Xing و همکاران در روی 350 زن چینی مبتلا به PCOS انجام گردید نشان داد پلی مورفیسم تک نوکلئوتید (SNP) در ناحیه پروموتور IL-10 می تواند در بیان پروتئین این ژن موثر بوده و در نتیجه حساسیت به بیماری را تحت تاثیر قرار دهد. با این حال، تنها چند مطالعه ارتباط بین پلی مورفیسم IL-10 و خطر سندرم تخمدان پلی کیستیک را در زنان گزارش کردند.

در مطالعه ای دیگری که در سال 2018 توسط Wang و همکاران در زنان قبیله هان در جمعیت چینی انجام شد پیشنهاد گردید که پلی مورفیسم IL-18 -137G / C می تواند به عنوان عامل پیش گیری کننده پاتوژن PCOS در بیماران مبتلا باشد. این مطالعه با مطالعه دیگری که توسط Yang و همکارانش در مورد همین پلی مورفیسم در جمعیت دیگری از زنان چینی انجام شد مطابقت داشت. علاوه بر آن این نتایج در مطالعه Kim و همکارانش در 126 نفر از زنان کره ای مبتلا به PCOS هم وجود داشت. این در حالی است که در یک مطالعه متا آنالیزی که توسط Wu و همکاران در سال 2015 انجام شده بود هیچ ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسم و بروز بیماری PCOS دیده نشد.

نشان داده شده است که اینترلوکین-6 (IL-6)، یک سیتوکین پیش التهابی عمده در التهاب مزمن بوده و به شدت با اختلالات IR (مقاومت انسولینی) و اختلالات قلب و عروق در ارتباط می باشد. چاقی، یک عامل خطر عمده برای افراد مبتلا به PCOS می باشد. گزارش شده است که میزان IL-6 در بیماران PCOS با کاهش میزان IR و شاخص توده بدنی (BMI) کاهش می یابد.

در مطالعه ای که توسط Villuendos و همکاران در سال 2002 در زنان مادرید اسپانیا انجام گردید، نشان داده شد که پلی مورفیسم های 597-G/C و 174-G/C از ژن IL-6 می تواند در پاتوژنز اختلالات هاپیر آندروژنیسم نقش داشته باشد.

در سال 2010 مطالعه Vural و همکارانش در زنان ترکیه، نشان داد که بین پلی مورفیسم 174-G/C از ژن IL-6 با بروز اختلالات متابولیکی در بیماری PCOS ارتباط معنی داری وجود دارد.

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی در مورد نقش IL-6 در بروز بیماری PCOS در زنان و از آنجائیکه پلی مورفیسم های مختلف از این ژن می تواند در این پروسه نقش داشته باشد بر آن شدیم تا مطالعه ای در خصوص یکی از پلی مورفیسم های شایع این ژن با بروز بیماری PCOS و همچنین نقش آن در پاتوژنز بیماری داشته باشیم.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

1-3- نوع پژوهش

این پژوهش از نوع توصیفی - تحلیلی می باشد.

2-3- جامعه پژوهش

جامعه پژوهش کلیه بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک و زنان نابارور مراجعه کننده به بیمارستان کوثر شهر قزوین بودند.

3-3- محیط پژوهش

در این مطالعه بیمارستان کوثر شهر قزوین به عنوان محیط پژوهش انتخاب شدند.

4-3- نمونه پژوهش

نمونه پژوهش شامل 125 بیمار بوده است.

5-3- روش نمونه گیری

نحوه انتخاب نمونه ها به صورت نمونه گیری در دسترس بود. حجم نمونه با توجه به فرمول زیر تعیین شد، به این ترتیب که هر یک از نمونه ها پس از انتخاب بر اساس معیارهای ورود و خروج وارد مطالعه می شدند و این کار تا زمانی که حجم نمونه ها به تعداد مورد نظر رسید ادامه داشت.

6-3- حجم نمونه

حجم نمونه با توجه به مطالعه پارکا و همکاران () و با در نظر گرفتن سطح اطمینان 95٪ و توان 90٪، براساس فرمول پوکاک و با در نظر گرفتن ریزش های احتمالی مطابق معادله زیر، در هر گروه محاسبه شد.

$$n = \frac{2 \left(z^{1-\frac{\alpha}{2}} + z^{1-\beta} \right)^2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2} = 125$$

3-7- معیارهای ورود به مطالعه

- محدوده سنی 18 تا 45 سال
- شاخص توده بدنی 25 تا 40 کیلوگرم بر مجذور متر

3-8- معیارهای خروج از مطالعه

- سابقه ابتلا به اختلالات تیروئیدی
- بیماری‌های کبدی
- بیماری‌های کلیوی
- بیماری‌های قلبی-عروقی
- دیابت
- سطح بالای پرولاکتین
- سندرم کوشینگ
- آندومتريوزیس
- بارداری
- مصرف هرگونه دارو به جز قرص‌های ضد بارداری ترکیبی خوراکی
- کشیدن سیگار
- داشتن برنامه ورزشی منظم و استفاده از هر نوع مکمل غذایی در 3 ماه گذشته یا در طول مطالعه

9-3- ابزار گردآوری اطلاعات

تشخیص بیماری بعد از سونوگرافی توسط متخصص زنان و زایمان براساس معیار رتردام 2003 صورت گرفت. علاوه بر آن مصاحبه حضوری جهت تکمیل پرسشنامه عمومی پژوهشگر ساخته انجام شد.

10-3- روش کار

این تحقیق یک مطالعه توصیفی تحلیلی بود. پس از کسب موافقت کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین، تعداد 125 نفر از بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک و 125 نفر از زنان نابارور که بعد از لاپاراسکوپي هیچ مدرکی دال بر وجود سندرم تخمدان پلی کیستیک نداشتند، به ترتیب به عنوان گروه مورد و گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند. افراد مورد مطالعه از زنان مراجعه کننده به بیمارستان کوثر استان قزوین، انتخاب شدند. تشخیص سندرم تخمدان پلی کیستیک بر اساس معیار رتردام 2003 و توسط پزشک متخصص زنان و زایمان انجام گرفت؛ به این صورت که زنانی که حداقل دو معیار از معیارهای آموره یا الیگوموره، سطوح افزایش یافته آندروژن ها و وجود تخمدان پلی کیستیک در سونوگرافی را داشتند، توسط پزشک به عنوان فرد مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک معرفی می شدند (30).

11-3- روش انجام آزمایش

از افراد مورد مطالعه در هر دو گروه به میزان 5 سی سی خون دریافت شد. نمونه خون در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA¹ جهت آزمایشات مولکولی جمع آوری گردید. ابتدا DNA نمونه های مورد مطالعه با استفاده از کیت کیاژن²، استخراج کردید. DNA استخراج شده باید 24 ساعت در دمای 4 درجه یخچال بماند تا به حالت پایدار³ برسد. DNA استخراج شده را به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز³ با استفاده از

¹ EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

² Stable

³ PCR: Polymerase Chain Reaction

پرایمرهای مربوطه تکثیر داده و در مرحله بعد قطعه DNA تکثیر شده را روی ژل آگارز 2 درصد حاوی اتیدیوم بروماید¹ قرار داده و الکتروفورز انجام می‌دهیم. سپس بر روی محصولات بدست آمده، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محدودیت طول قطعات پلی مورفیسم² و ژل الکتروفورز انجام می‌دهیم.

مراحل استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از نمونه‌های مورد نظر کیت QIAMP MINI KIT مربوط به شرکت کیاژن استفاده شد. کیت حاوی بافرهای AE، AW1، AW2، AL و پروتئیناز K و حلال آن و ستون مجهز به فیلتر غشایی از جنس سیلیکاژل بود. مطابق دستورالعمل کیت، پروتئیناز K لیوفیلیزه با استفاده از حلال موجود حل گردید. بافرهای AW1 و AW2 توسط اتانول مطلق رقیق شدند. به طور کلی در طی استخراج ابتدا در حضور آنزیم پروتئیناز K و بافر لیزکننده سلول (AL) گلول‌های سفید لیز شده و سپس با عبور از ستون، DNA آزاد شده از سلول جذب فیلتر غشایی گردید. پروتئین و سایر آلودگی‌هایی که قادر به مهار PCR می‌باشند طی دو مرحله سانتریفوژ و شستشو با بافرهای مخصوص (AW1، AW2) از فیلتر عبور کرده و در محفظه پایین فیلتر جمع‌آوری و دور ریخته شدند. در نهایت با استفاده از بافر AE، DNA چسبیده به فیلتر شسته و جدا شده و در میکروتیوب جمع‌آوری شد.

روش کار :

1. ابتدا در اپندورف‌های 1/5 میلی‌لیتر از پروتئیناز K، 20 میکرولیتر در هر اپندورف به تعداد نمونه‌هایی که می‌خواهیم استخراج کنیم می‌ریزیم. پروتئیناز، پروتئین‌هایی که DNA به آنها چسبیده را هضم می‌کند تا خلوص DNA زیاد شود.

¹ Ethidium Bromide

² RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

2. 200 لانداز از نمونه‌های خون داخل میکروتیوب‌های دارای پروتئیناز K می‌ریزیم و توسط دستگاه

ورتکس می‌کنیم تا خوب مخلوط گردد

3. سپس 200 میکرولیتر از بافر AL درون میکروتیوب مذکور می‌ریزیم که این کار باعث لیز سلول‌ها

می‌شود. موقع ریختن AL باید دقت کرد نوک سمپلر به کناره یا بدنه اپندورف نخورد.

4. به مدت 15 ثانیه تک‌تک میکروتیوب‌ها را ورتکس می‌کنیم تا مخلوط همگن به دست آید. سپس

در قسمت پایین ورتکس نمونه‌های ورتکس شده را روبروی هم قرار می‌دهیم. (به تعداد تهیه شده

مثلاً 4 تا 4 تا) و فقط یک بار spin انجام می‌دهیم. بهتر است قفل دهانه نمونه‌ها به طرف داخل

باشد تا موقع اسپین باز نشوند این کار باعث می‌شود تا هرگونه قطره متصل به جدار میکروتیوب

وارد محلول شود.

5. میکروتیوب‌ها را به مدت 10 دقیقه در 56 درجه سانتیگراد داخل دستگاه heat block (انکوباتور

مخصوص میکروتیوب) قرار می‌دهیم تا فرایند لیز شدن تسریع شود. (در این مدت ستون‌ها را

آماده می‌کنیم) این کیت ستون‌هایی دارد که باعث جذب DNA می‌شود.

6. سپس 200 لانداز اتانول مطلق 96٪ به میکروتیوب اضافه شد سپس ورتکس و spin انجام می‌شود

تا به طور کامل مخلوط گردد) اتانول، DNA را در محیط به حالت رسوب در می‌آورد و رسوب

جدا می‌شود. (قبل از اینکه ورتکس کنیم بالای نمونه‌ها بعد از ریختن اتانول کدورت و تیرگی می‌-

بینیم که همان DNA و پروتئین است.)

7. محلول‌ها به ستون‌های حاوی فیلتر غشایی که روی آن‌ها شماره نمونه‌ها زده شده است منتقل

می‌گردد. با هر دست یکی از نمونه‌ها را گرفته و در ستون‌ها خالی می‌کنیم. ستون حاوی فیلتری

است که DNA را می‌گیرد. موقع خالی کردن نمونه‌ها در ستون‌ها بهتر است دقت شود تا در رینگ

داخل ستون چیزی ریخته نشود.

8. ستون‌ها را به مدت 1 دقیقه در 8000 دور سانتریفوژ می‌کنیم تا مواد اضافه شسته شده و DNA در فیلتر گیر کند (سانتریفوژ باید حتماً بالانس باشد).
9. وقتی ستون‌ها را نگاه می‌کنیم فیلتر قرمز رنگ است یعنی هموگلوبین دارد و آلوده است. فیلترها را از جای قبلی خود خارج کرده و ستون محتوی فیلتر را در لوله جمع‌آوری جدید قرار می‌دهیم و محلول فیلتر شده زیرین را دور می‌ریزیم. موقع خارج کردن باید دقت کرد مایع پائین، بالا نپرد و به فیلتر نچسبد.
10. به میزان 500 میکرولیتر بافر الکلی AW1 بر روی فیلتر اضافه می‌شود تا ناخالصی‌ها را از فیلتر بشوید سپس در 8000 دور به مدت 1 دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم و پس از سانتریفوژ محلول فیلتر شده دور ریخته می‌شود.
11. دوباره فیلترها خارج شده و در لوله‌های جدید کوچک تمیز قرار می‌گیرد و 500 میکرولیتر از بافر AW2 بر روی فیلتر ریخته می‌شود.
12. در 14000 دور به مدت 3 دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم تا بافر به سرعت فیلتر را بشوید و الکل از فیلتر پاک شود و خشک و سفید شود.
13. دوباره روی اپندورف‌های جدید شماره نمونه می‌زنیم و فیلترها را در آن‌ها قرار می‌دهیم. (در اپندورف‌های درب دار) چون می‌خواهیم DNA را نگه داری کنیم از ظرف‌های درب‌دار استفاده می‌کنیم (ظرف‌های لوله‌ای و بدون درب برای شستشو است).
14. اکنون باید کاری کرد تا DNA از فیلتر شسته شود 200 لانداز بافر AE که برای extraction است را روی نمونه‌هایی که در اپندورف قرار دارند می‌ریزیم و به مدت یک دقیقه در دمای محیط قرار می‌دهیم تا محلول فیلتر را خیس کند. سپس در 8000 دور به مدت یک دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم. علت کم شدن دور سانتریفوژ این است که مایع آهسته از فیلتر رد شود و همه DNA شسته شود.

موقع قرار دادن اپندورف‌ها در سانتریفوژ باید دقت کرد تا درب‌ها داخل سانتریفوژ قرار گیرد چون درب آن‌ها باز است و بسته نمی‌شود.

15. فیلترهای غشایی را خارج کرده و دور می‌اندازیم. اکنون میکروتیوبی حاوی 200 میکرولیتر از محلول شفاف و بی‌رنگ DNA استخراج شده داریم و حداقل 24 ساعت در دمای 4 درجه سانتیگراد داخل یخچال معمولی قرار می‌دهیم تا DNAها که بر اثر الکل کلاف مانند شده‌اند به حالت پایدار برسند. اگر با نمونه‌ها کار داشتیم بعد از 24 ساعت روی آن‌ها کار انجام می‌دهیم اگر کار نداشتیم بعد از 24 ساعت که در یخچال معمولی ماندند به فریزر 80 درجه سانتیگراد زیر صفر منتقل می‌کنیم. پس از استخراج DNA روی نمونه‌های DNA استخراج شده PCR انجام می‌دهیم.

تعیین غلظت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری

پس از استخراج DNA به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA و آگاهی از میزان خلوص آن با استفاده از اسپکتروفتومتر غلظت DNA تعیین می‌گردد. بدین منظور 5 میکرولیتر از محلول DNA استخراج شده را با 45 میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط کرده و رقت 1/10 تهیه کرده سپس میزان جذب نوری و غلظت DNA محلول فوق را در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 260 و 280 نانومتر که به ترتیب طول موج حداکثر جذب نوری DNA و پروتئین است در مقابل بلانک آب مقطر قرائت نموده و میزان DNA بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر محاسبه گردید. جهت تعیین خلوص DNA حاصله از نسبت جذب نمونه در 260 نانومتر بر جذب آن در 280 نانومتر استفاده می‌شود که نسبت 1/8-2 بیانگر خلوص جذب DNA استخراج شده است و هرچه این نسبت کاهش یابد بیانگر ناخالصی DNA استخراجی و آلودگی آن با پروتئین می‌باشد. با تهیه تناسب غلظت هر محلول DNA را می‌توان با استفاده از رابطه زیر تعیین نمود.

$$\text{غلظت DNA (میکروگرم بر میکرولیتر)} = 50 \times \text{OD}_{260\text{nm}} \times f \text{ (فاکتور رقت)}$$

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

این تکنیک در اواسط دهه 1980 بوسیله کری مولیس¹ معرفی شد. به دلیل کاربردها و مزیت‌های بسیار زیاد آن به سرعت در زیست‌شناسی مولکولی گسترش پیدا کرد. امروزه این روش تقریباً در تمامی آزمایشگاه‌های زیست مولکولی جزو کارهای متداول می‌باشد و به صورت اتوماتیک به وسیله کامپیوتر انجام می‌شود. در سیستم‌های تکثیر اسید نوکلئیک در آزمایشگاه مولکول هدف (DNA یا RNA) به طور آنزیماتیک به تعداد زیادی همانندسازی می‌گردد تا میزانی که به توان محصول را با روش‌هایی مثل الکتروفورز در ژل آشکار نمود.

این تکنیک تمامی مشکلات قبلی در زیست مولکولی که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA یکسان بود را برطرف کرد. برای مثال قبلاً برای بدست آوردن نسخه‌های متعدد از یک ژن خاص می‌بایست این ژن را به داخل حامل مناسب وارد کرده و در یک باکتری تکثیر کنند ولی امروزه این کار را به سادگی و با استفاده از PCR انجام می‌دهند.

در این قسمت تکنیک PCR و بعضی از کاربردهای اصلی آن مورد بررسی قرار می‌گیرد.

اولین و شاید بتوان گفت مهم‌ترین و بهترین سیستمی که در آن مولکول هدف افزایش تعداد می‌یابد، تکنیک PCR می‌باشد. PCR از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانندسازی DNA دارد و در واقع برگرفته از آن است. یادآوری می‌شود که DNA پلیمراز، DNA تک رشته‌ای را از جهت 3 پریم به 5 پریم می‌سازد. همچنین DNA پلیمراز برای شروع احتیاج به یک قطعه اولیه (شناساگر) دارد.

¹ Kary Mullis

در هنگام تغییر ماهیت DNA (denaturation) با حرارت دادن می‌توان دو رشته DNA را از هم جدا کرد و با سرد کردن می‌توان دوباره دو رشته DNA را با هم جفت کرد که به این خاصیت جوش خوردن (anneal) می‌گویند. حال با دانستن اصول فوق چگونگی انجام PCR مورد بررسی قرار می‌گیرد.

چگونگی انجام PCR

برای انجام PCR، DNA پلیمراز، نوکلئوتیدتری فسفات‌ها و پرایمر لازم هستند. از آنجاییکه DNA دورشته‌ای است، دو نوع پرایمر در PCR مورد نیاز است. این دو پرایمر دو عمل انجام می‌دهند: اول این که محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می‌نمایند و دوم این که اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می‌کنند. عمل اول کاملاً مشخص است در مورد عمل دوم باید گفت که وقتی این دو شناساگر به دو ناحیه مختلف DNA و به سمت هم قرار می‌گیرند DNA پلیمراز تنها قطعات را در بین این دو ناحیه همانندسازی می‌کند و به این ترتیب طول قطعات ساخته شده تعیین می‌شود.

برای شروع PCR، DNA الگو، پرایمرها و نوکلئوتیدتری فسفات‌ها و DNA پلیمراز در یک لوله با هم مخلوط می‌شوند. سپس لوله را گرم می‌کنند تا دو رشته DNA از هم جدا شوند. سپس لوله را سرد می‌کنند تا پرایمرها به نواحی مورد نظر متصل شوند و DNA پلیمراز شروع به همانندسازی از روی DNA بنماید. دوباره سیستم سرد می‌شود تا بار دیگر پرایمرها به نواحی مکمل خود متصل شوند. چون در مرحله قبل رشته DNA در ناحیه مورد نظر مضاعف شده است، در این مرحله چهار رشته الگو برای همانندسازی وجود دارد و در نتیجه در پایان این مرحله چهار نسخه از ژن مورد نظر حاصل می‌شود. بار دیگر سیستم گرم می‌شود و در اینجا هشت نسخه به وجود می‌آید، و در مرحله بعد 16 نسخه و به همین ترتیب به صورت تصاعدی تعداد نسخه‌های ژن‌ها زیاد می‌شود. به طور کلی پس از n تکرار ما در محلول 2^n نسخه از ژن مورد نظر خواهیم داشت. مثلاً پس از 20 بار تکرار یعنی 262144 نسخه و پس از 30 بار تکرار

268435456 نسخه ایجاد خواهد شد که خیلی بیشتر از نیازهای معمولی برای انجام کارهای

زیست‌شناسی مولکولی می‌باشد.

مراحل انجام PCR

أ. مرحله واسرشت: به طور معمول دمای 94 درجه یا بالاتر به مدت 10-15 ثانیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حقیقت زمان 1-2 ثانیه برای جدا شدن رشته های DNA از یکدیگر کافی است اما با در نظر گرفتن زمان مرده (lag phase) برای انتقال دما به داخل تمام نقاط لوله واکنش و اطمینان به جدایی کامل رشته‌های DNA زمان بیشتری را در نظر می‌گیرند. چنانچه زمان یا دمای کافی در این مرحله در نظر گرفته نشود باز نشدن کامل رشته‌های DNA باعث کاهش کارایی واکنش شده و از طرف دیگر تولید محصولات غیر اختصاصی را افزایش می‌دهد. اگر در مرحله واسرشت، دما بسیار بالا و یا زمان آن طولانی باشد موجب از دست رفتن و غیرفعال شدن مواد موجود در واکنش شده و فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد.

ب. مرحله اتصال: اتصال پرایمرها به مولکول DNA هدف یا محصولات PCR در این مرحله انجام می‌گیرد که بلافاصله بعد از مرحله واسرشت است. با کاهش دما از مرحله واسرشت به تدریج بیشتر مولکول‌های DNA تک رشته، مکمل‌های خود را پیدا می‌کنند و با یکدیگر اتصال می‌یابند. در این مرحله بیش‌تر پرایمرها به توالی‌های مکمل خود می‌چسبند و به علت این که تغییر دما از زیاد به کم انجام می‌شود ابتدا اتصال اختصاصی اتفاق می‌افتد و سپس با کاهش بیش‌تر دما اتصالات غیر اختصاصی افزایش می‌یابد. هرچه میزان GC پرایمر، غلظت و طول آن بیشتر باشد دما و زمان در نظر گرفته شده در این مرحله بیشتر خواهد بود که در مورد هر جفت پرایمر و هر سیستم PCR باید به طور اختصاصی محاسبه شود. معمولاً زمان 20-5 ثانیه و دمای 55-72 درجه

در این مرحله نتیجه خوبی می‌دهد. بالاتر بودن دمای اتصال به ویژه در سیکل‌های اولیه (5 سیکل ابتدایی) باعث افزایش اختصاصیت واکنش می‌شود.

ج. مرحله ساخت (ستتز نهایی): دما در این مرحله 70-72 درجه سانتیگراد در نظر گرفته می‌شود و زمان مورد نیاز به طول توالی هدف و غلظت آن بستگی دارد. تخمین تعداد نوکلئوتیدی که در هر ثانیه آنزیم پلیمراز در ناحیه 3 پریم جایگزین می‌کند مشکل است و به ترکیب بافر، pH، غلظت نمک‌ها و طبیعت DNA الگو (از نظر منشأ و ساختمان ثانویه) بستگی دارد به عنوان مثال معمولاً زمان 1 دقیقه برای ستتز DNA الگو با طول 2kb کافی است. در سیکل پایان معمولاً زمان 5-10 دقیقه‌ای برای این مرحله در نظر گرفته می‌شود که با توجه به کاهش مواد اولیه مثل dNTP و پرایمر در سیکل‌های آخر و احتمال وجود محصولات کوتاه زمان کافی را برای ساخت کامل زنجیره‌های مکمل فراهم می‌سازد.

د. تعداد سیکل: هنگامی که دیگر پارامترهای یک سیستم PCR بهینه شده باشند تعداد سیکل به مقدار DNA اولیه وابسته است. برای تعداد کم کپی توالی هدف (در حد 50 کپی) معمولاً بین 40-45 سیکل را در نظر می‌گیرند. در مواردی که کپی هدف در نمونه بالا باشد مثل بررسی ژنوم انسان در بیماری‌های ژنتیک تعداد 25 تا 30 سیکل کافی است. ضمناً دمای الحاق پرایمر بر این اساس محاسبه می‌شود.

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

نمونه‌های PCR شده در فریزر -80 درجه سانتیگراد نگهداری می‌شوند.

برای انجام PCR از 3 Step PCR استفاده کردیم که شامل شرایط زیر می‌باشد و این سیکل 30 بار تکرار شد:

1. دناتوراسیون اولیه در دمای 95 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه
2. دناتوراسیون در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه و سپس اتصال الگو به پرایمر (Annealing) در دمای 53 درجه به مدت 30 ثانیه و به دنبال آن گسترش (Extension) در دمای 72 درجه به مدت 30 ثانیه
3. گسترش نهایی در دمای 72 درجه به مدت 7 دقیقه انجام گرفت و در نهایت قطعه‌ای به طول 270 جفت بازی را تکثیر نمودیم.

جدول 3-1 مشخصات تنظیمات واکنش PCR مورد استفاده در این مطالعه

Steps	Denaturation	Anneling	Extension
Initial Denaturing	94 درجه، 6 دقیقه		
35 cycle	94 درجه، 30 ثانیه	58 درجه، 30 ثانیه	72 درجه، یک دقیقه
Final Extension			72 درجه، 10 دقیقه

عملکرد اجزای PCR

بافر: محیط شیمیایی مناسبی را برای فعالیت و پایداری DNA پلیمراز فراهم می‌کند و شامل تریس هیدروکلراید با pH=8/4 و کلرید پتاسیم 500 میلی مولار است.

محلول $MgCl_2$: یون منیزیم با dNTP کمپلکس محلولی تشکیل داده و اتصال dNTP به انتهای پرایمر را تسهیل می‌کند. به علاوه منیزیم جهت فعالیت DNA پلیمراز ضروری است.

dNTP: جهت ساخت رشته مکمل dNTPs مورد نیاز می‌باشد.

DNA پلیمراز: معروف‌ترین آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت Taq DNA polymerase می‌باشد که فرم طبیعی آن از باکتری *Thermus aquaticus* به دست می‌آید.

پرایمر: پرایمرها الیگونوکلئوتیدهایی به طول 20 تا 30 نوکلئوتید هستند. پس از این که DNA الگو توسط حرارت واسرشت می‌شود پرایمرها در دو طرف توالی هدف متصل شده و امکان شروع فعالیت DNA پلیمراز را فراهم می‌کنند. پرایمر با توجه توالی قطعه‌ای از DNA که باید تکثیر شود طراحی می‌گردد. علاوه بر توالی موارد دیگری نیز در طراحی پرایمر مدنظر قرار می‌گیرد به طوری که تا حد امکان پرایمر تنها به قطعه مورد نظر DNA الگو متصل شود و برای آن اختصاصیت داشته باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز جهت انجام PCR

میکروتیوب، میکروسانتریفوژ، دستگاه ترموسایکلر، سمپلر، سر سمپلر (اپندورف) و مواد لازم بر اساس کیت مورد نظر.

به طور معمول یک دستورالعمل عمومی همراه با اجزا توسط شرکت تولیدکننده توزیع می‌گردد که به عنوان راهنما استفاده می‌شود و اگر نتایج مناسب حاصل نگردید (وجود باند ضعیف، باندهای اضافی، عدم وجود باند) به تغییر مقدار این مواد در تهیه مخلوط PCR می‌پردازیم. در جدول 2-3 مقدار هر یک از اجزا جهت تهیه 25 میکرولیتر مخلوط PCR و غلظت نهایی آن نشان داده شده است. در روش PCR برای هر نمونه DNA از مواد ذیل در هر میکروتیوب جداگانه می‌ریزیم. زمانی که oil می‌ریزیم باید دقت کنیم حباب ایجاد نشود. پس از ریختن مقادیر فوق به ازای هر نمونه، آمپلیکون تهیه شده را به دستگاه ترموسایکلر منتقل می‌کنیم تا مراحل PCR طی شود پرایمری که در PCR استفاده می‌شود (R, F) را با آب مقطر به نسبت 1 به 10 رقیق می‌کنیم. مثلاً 20 لاندا پرایمر با 180 لاندا آب مقطر. پرایمر غلیظ باید در یخچال 80 درجه سانتیگراد زیر صفر نگهداری شوند و موقع استفاده در یخ قرار گیرند. کلیه نمونه‌ها را با استفاده از این روش PCR و سپس ژل الکتروفورز می‌کنیم.

جدول 3- 2 حجم مورد نیاز و غلظت نهایی اجزا جهت تهیه مخلوط PCR

حجم مورد نیاز جهت تهیه مخلوط PCR	اجزاء PCR
5 میکرولیتر	بافر
4 میکرولیتر	پرایمر P2F= forward
4 میکرولیتر	پرایمر P2R = reverse
10 میکرولیتر	DNA
یک میکرولیتر	آنزیم PFU
25 میکرولیتر	آب مقطر
20 میکرولیتر	oil

مراحل کار با ترموسایکلر

1. روشن کردن دستگاه

2. BROWS/NEW METHOD

3. انتخاب گزینه ذخیره شده

4. View جهت دیدن برنامه‌های داده شده به دستگاه

5. RUN

6. دادن زمان مرحله‌ها

7. START RUN

نمونه‌ها به مدت یک ساعت و پانزده دقیقه داخل ترموسایکلر می‌مانند.

پس از پایان PCR (زمان ترموسایکلر) amplicon ها (محصولات) را خارج کرده و سپس ژل الکتروفورز

انجام دادیم. همچنین می‌توان به جای آنزیم و بقیه مواد لازم از mastermix استفاده کردیم که شامل ENZ،

MgCl₂، بافر و dNTP می‌باشد. نسبت‌های مورد استفاده در تهیه آمپلیکون‌ها به صورت جدول 3-3

می‌باشد.

جدول 3-3 حجم مورد نیاز و غلظت نهایی اجزا جهت تهیه مخلوط PCR

اجزاء PCR	حجم مورد نیاز جهت تهیه مخلوط PCR
mastermix	12/5 میکرولیتر
P2F= forward پرایمر	1/25 میکرولیتر
P2R = reverse پرایمر	1/25 میکرولیتر
DNA	5 میکرولیتر
آب مقطر	5 میکرولیتر
oil	10 میکرولیتر
جمع	35 میکرولیتر

جهت سهولت کار هر کدام از نسبت‌های بالا را 10 برابر می‌کنیم (غیر از DNA و oil) آن‌ها را در یک میکروتیوب بزرگ می‌ریزیم که 200 لاندا می‌شود و آن را vortex و سپس سانتریفوژ می‌کنیم. سپس میکروتیوب‌های کوچک را شماره‌گذاری کرده و 20 لاندا از مخلوط را در هر کدام می‌ریزیم سپس 5 لاندا از DNA را به هر کدام اضافه کرده و سانتریفوژ می‌کنیم تا مخلوط شود. پس از آن به هر کدام 10 لاندا از oil ریخته و دوباره سانتریفوژ می‌کنیم و سپس آن را به دستگاه ترموسایکلر منتقل می‌کنیم. پس از پایان زمان کار با ترموسایکلر که شامل 35 سیکل و به مدت 1 ساعت و 30 دقیقه طول کشید محصولات PCR را خارج کرده و بر روی ژل 2 درصد از هر کدام به میزان 5 میکرولیتر را الکتروفورز می‌کنیم.

ژل الکتروفورز

بررسی و تشخیص محصولات PCR به کمک الکتروفورز انجام می‌شود و آشکار کننده معمولاً اتیدیوم بروماید است. الکتروفورز روشی برای جداسازی، تشخیص و تخلیص قطعات DNA می‌باشد. این تکنیک ساده و سریع انجام می‌شود و اساس آن تفکیک مولکول‌های باردار همچون DNA بر اساس مقدار بار،

اندازه و جرم است. الکتروفورز به دو روش متفاوت افقی و عمودی انجام می‌شود که در الکتروفورز افقی به طور معمول از ژل آگارز استفاده می‌شود. برای تأیید PCR باید تغییراتی که روی DNA ایجاد شده است رویت گردد. مشاهده DNA متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید امکان‌پذیر خواهد بود. برای انتخاب درصد آگارز از جدول 3-4 استفاده می‌شود.

جدول 3-4 درصد آگارز و قدرت تفکیک آن

درصد ژل آگارز	قدرت جداسازی DNA
3	100-1000bp
2	200-1500bp
1/5	300-3000bp
1	500-5000bp
0/8	1000-7000bp
0/6	10-30kbp
0/4	30-50kbp

پس از خارج کردن نمونه‌ها از دستگاه ترموسایکلر به طریق ذیل ژل الکتروفورز انجام می‌دهیم:

ابتدا وسایل را با آب مقطر می‌شوئیم

قالب ژل را آماده می‌کنیم

شانه‌ای با دنده‌های مناسب روی قالب قرار می‌دهیم

پودر آگارز را به مقدار 1/4 گرم وزن می‌کنیم بافر (TBE (Tris Borate EDTA را که به غلظت 5X ساخته می‌شود را به نسبت 1 به 5 رقیق می‌کنیم (1X) به این ترتیب که 100 میلی‌لیتر از بافر 5X را با 400 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرده و بافر رقیق شده را در تانک می‌ریزیم. این بافر با ایجاد بار منفی در مولکول‌های اسید نوکلئیک باعث حرکت آن‌ها از قطب منفی (کاتد) به مثبت (آند) می‌گردد و برحسب اندازه و میزان حرکت از هم جدا می‌شوند.

طریقه ساختن بافر 5X

برای تهیه این بافر 108 گرم از Tris-base را با 55 گرم اسید بوریک ترکیب کرده و بعد از اضافه نمودن 9/3 گرم پودر EDTA به وسیله آب مقطر آن را به حجم یک لیتر رساندیم (TBE 1X). معمولاً برای تهیه این بافر از حجم 5X استفاده می‌شود برای این کار باید تمام حجم‌های بالا را 5 برابر تهیه کرد که به صورت استوک ذخیره می‌شود و در هنگام کار باید محلول استوک 1 به 5 رقیق گردد. بعد از استخراج DNA و تأیید آن در ژل آگاروز مرحله بعدی انجام آزمایش PCR بر روی نمونه‌ها است.

ژل مورد استفاده را 2 درصد درست می‌کنیم یعنی 2 گرم از آگارز را در 100 میلی‌لیتر بافر TBE می‌ریزیم ولی چون تانک بیش‌تر از 70 میلی‌لیتر نمی‌گیرد 1/4 گرم آگارز را در 70 میلی‌لیتر بافر می‌ریزیم سپس ژل ساخته شده در ارلن را در میکروفر به مدت یک دقیقه قرار می‌دهیم تا هم استریل شود و هم آگارز خوب حل شود وقتی ارلن داخل میکروفر است آن را خوب نگاه می‌کنیم و موقعی که محلول در حال غل‌غل کردن است و می‌خواهد از ارلن بیرون بریزد آن را خاموش می‌کنیم و ارلن را خارج کرده و خوب تکان می‌دهیم تا محلول یکنواخت به دست آید. سپس 5 لاندا اتیدیوم بروماید به ازای 100 سی‌سی ژل اضافه می‌کنیم که چون ژل ما 70 سی‌سی است 3/5 لاندا اتیدیوم بروماید می‌ریزیم.

اتیدیوم بروماید

اتیدیوم بروماید با فرمول $\text{Br}_3\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{C}$ و وزن مولکولی 394/4 گرم بر مول به عنوان یک نشان غیر رادیواکتیو برای تشخیص و دیدن باندهای اسید نوکلئیک در الکتروفورز و در روش جداسازی اسید نوکلئیک‌ها بر اساس ژل استفاده می‌شود. اتیدیوم بروماید یک ماده قرمز تیره، کریستالی، جامد، غیرفرار، به طور متوسط محلول در آب که دارای خاصیت فلورسانس و رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز در هنگام قرار گرفتن در معرض اشعه UV می‌باشد. اگرچه یک ابزار مناسب برای تحقیق می‌باشد ولی به خاطر

خصوصیات خطرناک آن، بایستی در هنگام جابجایی و دفع به نکات ایمنی و بهداشتی آن توجه نمود. اتیدیوم بروماید یک موتاژن قوی با خاصیت سمی متوسط بعد از یک تماس حاد است. اتیدیوم بروماید می‌تواند از طریق پوست جذب فوری شود، بنابراین ممانعت از تماس با این ماده شیمیایی بسیار مهم می‌باشد. این ماده همچنین محرک پوست، چشم، بینی و دستگاه فوقانی تنفسی می‌باشد. اتیدیوم بروماید یک رنگ فلوئورسنس است و توانایی وارد شدن در DNA دورشته‌ای را دارد.

مشاهده قطعات DNA

به طور معمول رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید انجام می‌شود. اتیدیوم بروماید یک ماده فلورسانس است که در مولکول دو رشته‌ای DNA بین جفت بازها وارد شده و سپس در حضور نور UV کمپلکس اتیدیوم بروماید-DNA قابل مشاهده می‌باشد. با توجه به این که این ماده در حضور بافر الکتروفورز بار مثبت پیدا می‌کند در نتیجه بر خلاف جهت حرکت DNA به سمت کاتد پیش رفته و از این طریق سرعت انتقال DNA در طول ژل کند خواهد شد. در حال حاضر ترکیبات ایمن‌تری مانند Syber Green و Gel Red در دسترس می‌باشد.

بعد از افزودن اتیدیوم، ژل را خوب مخلوط کرده و به داخل قالب که در یک سمت آن شانه‌ای قرار گرفته است می‌ریزیم و صبر می‌کنیم تا ببندد و البته اگر در ابتدای ریختن ژل در قالب حباب ایجاد شد آن‌ها را با نوک سمپلر از بین می‌بریم.

6. پس از بستن ژل شانه را خارج می‌کنیم و ژل را از قالب خارج کرده و داخل تانک الکتروفورز قرار می‌دهیم و روی آن بافر TBE می‌ریزیم پس از این کار آمپلیکون‌ها را که داخل ترموسایکلر هستند خارج می‌کنیم و به نسبت 1 به 6 با loading مخلوط کرده و به داخل چاهک می‌ریزیم به‌تراست 2

لاندا از loading (بافر dye یا همان بافر حامل) را با 12 لانداز amplicon ها) محصول PCR)

مخلوط کرده و در داخل چاهک‌ها run کنیم.

در اولین چاهک مارکر (ladder) قرار می‌دهیم. بعضی ladder ها خودشان loading dye دارند اگر نداشت آن را با loader مخلوط کرده (از هر کدام 2 لانداز) و سپس به عنوان مارکر استفاده می‌کنیم تا تشخیص اندازه قطعات DNA ناشناخته را امکان پذیر سازد.

Loading به منظور اطمینان از قرار گرفتن نمونه در چاهک ژل استفاده می‌شود. محصول PCR بایستی با رنگ loading مخلوط گردد. این رنگ حاوی یک ترکیب رنگی مانند بروموفنل‌بلو و زایلول سیانول¹ و همچنین یک ماده ویسکوز و غلیظ مانند گلیسرول یا سوکروز می‌باشد. مخلوط شدن محصول PCR با ترکیبات ویسکوز باعث افزایش غلظت محصول PCR و تسهیل در رسوب نمونه در چاهک ژل می‌گردد. ترکیب رنگی همانند DNA در حضور بافر، بار منفی پیدا کرده و به سمت آند حرکت خواهد کرد. با توجه به محل رنگ مکان تقریبی DNA بر روی ژل قابل پیش‌بینی خواهد کرد.

7. بافر تانک باید کاملاً روی ژل را بپوشاند.

8. DNA دارای شارژ منفی است و برای الکتروفورز شدن باید نمونه به طرف قطب منفی باشد تا هنگام الکتروفورز به سمت قطب مثبت حرکت کند.

9. درب تانک را گذاشته سیم‌ها را به منبع تغذیه وصل می‌کنیم پیچ current را روی ماگزیمم قرار داده و ولتاژ را تنظیم می‌کنیم. حرکت حباب در سمت چپ نشانه عبور جریان برق می‌باشد.

10. وقتی رنگ نشانه سه چهارم طول ژل را طی کرد ژل را از تانک خارج کرده و آن را در دستگاه ترانس لومینیتور گذاشته و باندهای DNA آشکار می‌شود. می‌توان از ژل عکس تهیه نمود. قابل ذکر

¹ Xylene cyanol

است به دلیل برخورداری از بار منفی در pH قلیایی جهت حرکت DNA به طرف آند یا قطب مثبت است.

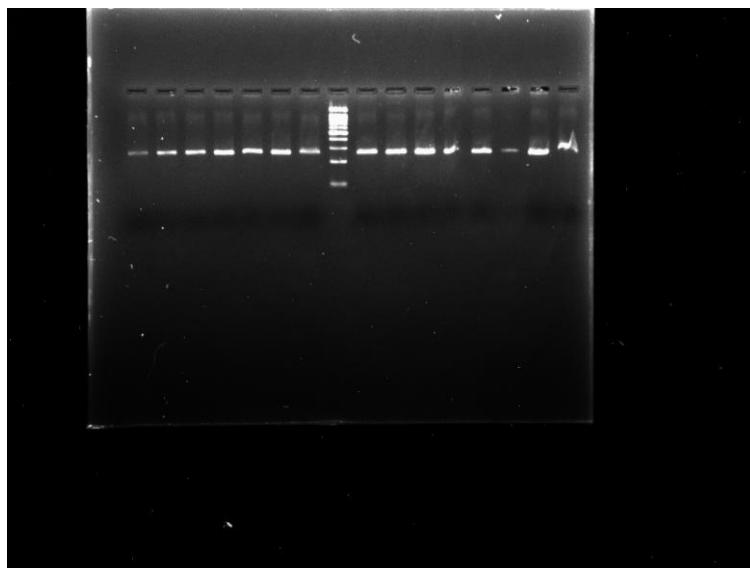
تنظیم ولتاژ

از ولتاژی معادل 10-5 V/CM با توجه به فاصله میان دو الکترود استفاده می‌شود. وجود حباب‌های گاز در اطراف کاتد و آند یا نشان دادن عبور جریان هنگام شروع الکتروفورز و حرکت اولیه بافر حامل به درون ژل موید انجام صحیح الکتروفورز می‌باشد. قابل ذکر است که باید از یک نوع بافر جهت تهیه ژل و تانک الکتروفورز استفاده شود مثلاً هر دو TBE باشد چون اختلافات کوچک در قدرت یون یا pH می‌تواند منجر به ایجاد موانعی بر روی حرکت DNA در ژل شود.

فاکتورهای موثر بر میزان حرکت DNA بر روی ژل

از عوامل موثر بر میزان حرکت DNA در طول ژل می‌توان به اندازه DNA، غلظت ژل، ولتاژ مورد استفاده و ساختار فضایی DNA (در مورد پلاسمیدها) اشاره کرد. مولکول‌های کوچک‌تر در مقایسه با مولکول‌های بزرگ‌تر DNA در طول ژل بیشتر حرکت می‌کنند. با افزایش غلظت ژل سرعت حرکت DNA کاهش می‌یابد. هر چه ولتاژ بیش‌تر باشد DNA سریع‌تر حرکت خواهد کرد. البته ولتاژهای بالاتر از 5-8 ولت بر سانتیمتر می‌تواند باعث ذوب شدن ژل و تخریب آگارز گردد و سبب می‌شود باندهای DNA به صورت منتشر دیده شوند.

نمونه‌هایی که از نظر وجود ژن IL6 مثبت بودند و دارای باند خوب و قوی بودند را با استفاده از روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ می‌کنیم.



شکل 3- 1 تصویر حاصل از ژل الکتروفورز محصول PCR

توالی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش با استفاده از نرم افزار 3-PRIMER طراحی گردید. پلی مورفیسم های IL6 ژن 174 (G/C) بر روی نمونه ها با روش PCR_RFLP با استفاده از دستگاه ترمو سایکلر (ABI مدل VERITY- امریکا) تعیین گردید. یک قطعه از DNA ژنومی شامل 295bp به روش PCR توسط پرایمرهای زیر تکثیر گردید

Forward -5'- GACTTCAGCTTTACTCTTTGT -3'
Reverse -5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'

.

پرایمرهای ذکر شده پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین پلی مورفیسم 174 (G/C) ژن IL6 می باشند که با آنزیم SFANI (تهیه شده از شرکت Fermentase) برش داده می شود.

PCR-RFLP

پس از انجام PCR و تکثیر قطعه مورد نظر جهت تعیین ژنوتیپ هر بیمار، نیاز به افزودن آنزیم اندونوکلاز محدودکننده به محصول PCR می باشد.

انجام RFLP

پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن IL-6 با استفاده از روش PCR-RFLP تعیین شد. پس از تهیه آنزیم SFANI بر نمونه‌های PCR شده RFLP صورت گرفت. ابتدا نمونه‌های PCR شده از 1 تا 15 را از فریزر خارج می‌کنیم. 15 میکروتیوب خالی را شماره‌گذاری کرده و در رک قرار می‌دهیم و بر اساس جدول ذیل و از روی بروشور آنزیم SFANI در هر میکروتیوب از مواد ذیل می‌ریزیم:

جدول 3-5 حجم مورد نیاز جهت تهیه مخلوط PCR-RFLP

حجم	اجزاء RFLP
2 میکرولیتر	بافر
یک میکرولیتر	آنزیم
10 میکرولیتر	PCR Product
17 میکرولیتر	آب مقطر
30 میکرولیتر	جمع

پس از این مرحله میکروتیوب‌ها را سانتریفوژ کرده و در جای خالی یونولیت می‌گذاریم و سپس یونولیت حاوی میکروتیوب‌ها را در بن ماری 37 درجه سانتی گراد به مدت 2 ساعت قرار می‌دهیم تا آنزیم اثر خود را در این مدت اعمال کند.

ژل الکتروفورز RFLP

تهیه ژل

جهت بررسی محصولات اولیه PCR از ژل آگارز 2 درصد و جهت بررسی نتایج محصولات PCR هضم شده توسط آنزیم RFLP از ژل 3 درصد استفاده شد.

در طول مدتی که میکروتیوب‌های حاوی محصول RFLP داخل بن ماری هستند ژل 3 درصد را می‌سازیم چون تانک ژل الکتروفورز 70 سی‌سی را می‌گیرد 2/1 گرم آگارز را در 70 سی‌سی بافر رقیق شده TBE

ریخته در مایکروفر می‌گذاریم تا بجوشد. وقتی آگار خوب جوشید و رنگ شفاف به خود گرفت 3/5 لانداز از اتیدیوم بروماید اضافه کرده و در داخل تانک که در یک طرف آن شانه قرار داده شده است می‌ریزیم تا ببندد. سپس شانه را خارج کرده که حجم هر چاهک ایجاد شده حدود 15 میکرولیتر می‌باشد و ژل را به داخل تانک الکتروفورز منتقل می‌کنیم به طوری که چاهک‌ها در سمت قطب منفی قرار گیرند. پس از 2 ساعت میکروتیوب‌ها را از بن‌ماری خارج می‌کنیم در داخل چاهک‌های اول و آخر ژل، مارکر می‌گذاریم.

2 لانداز از loading را با 2 لانداز ladder DNA خوب مخلوط کرده و به عنوان مارکر استفاده می‌کنیم و در داخل چاهک‌های اول و آخر run می‌کنیم. سپس به نسبت 1 از loading را با 6 از amplicon تهیه شده مخلوط کرده که به صورت 2 لانداز از loading و 12 لانداز از amplicon می‌باشد. سپس جریان برق را وصل کرده و پس از حدود نیم ساعت ژل را به دستگاه نمایشگر (UVTransilluminator) UV منتقل کرده و باندها را دیده و ژنوتیپ نمونه‌ها را در هر پلی‌مورفیسم تعیین می‌کنیم. در صورت نیاز عکس گرفته و شکل ژل و باندها را در یک فلایپی ذخیره می‌کنیم.

12-3- تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. برای نمایش داده‌ها از جداول توصیفی استفاده شد. اختلاف میانگین متغیرهای کیفی با استفاده از Chi-squared Test و بررسی اختلاف مقدار میانگین متغیرهای کمی با استفاده از آزمون t-test مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ارتباط و درصد تجمعی در بین پلی‌مورفیسم‌ها بررسی گردید. از SPSS v.24 برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. سطح معنی داری، کمتر از 5 درصد در نظر گرفته شد.

13-3- ملاحظات اخلاقی

پژوهشگر معرفی نامه کتبی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین را به بیمارستان محل اجرای مطالعه ارائه و مجوز انجام پژوهش را دریافت نمود. پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق، نمونه گیری انجام شد.

- هدف از انجام پژوهش برای مسئولین بیمارستان توضیح داده شد.
- آگاهی لازم در مورد اهداف و کلیه جزئیات مربوط به تحقیق و اجازه تصمیم گیری برای شرکت در مطالعه به نمونه ها قبل از نمونه گیری داده شد.
- برای نمونه ها درباره اختیار خروج از مطالعه در هر زمان، اطلاع رسانی صورت گرفت.
- اطمینان کافی در مورد محرمانه بودن اطلاعات به کلیه نمونه های پژوهش داده شد.
- رضایت نامه کتبی آگاهانه و داوطلبانه از نمونه ها اخذ گردید.
- هیچ یک از اعضا تیم پژوهش اجازه نداشتند نمونه ها را برای ادامه مشارکت در مطالعه مورد اجبار، تطمیع، اغوا، تهدید و یا تحت فشار قرار دهند.
- رعایت اصول اخلاقی در جمع آوری داده ها، تحلیل، و ارائه گزارش مبتنی بر نتایج واقعی انجام شد.
- تمامی هزینه های پژوهش توسط محقق پرداخت شد و بیمار هیچگونه هزینه ای را متقبل نگردید.
- تمامی چک لیست ها بدون نام بود و اطلاعات محرمانه تلقی شد.
- در استفاده از منابع علمی نهایت دقت در رعایت حقوق ادبی و حفظ امانت در برگرداندن مطالب به زبان پارسی با ذکر منبع صورت گرفت.

14-3- متغیرها

متغیرهای متفاوتی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت که هر یک از آنها در جدول 3-6 قابل مشاهده می باشد.

جدول 3-6 متغیرهای مورد بررسی در این مطالعه

متغیر	متغیر زمینه ای	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف عملی	مقیاس
				پویسته	گسته	اسمی	رتبه ای		
سن	*			*				سن شناسنامه ای افراد براساس سال هجری شمسی	سال
جنسیت	*					*		مذکر یا مونث بودن	مرد- زن
قد	*			*				فاصله انتهای پا تا نوک سر هر شخص در حالت ایستاده و عمودی	متر
وزن	*			*				به نیرویی که در اثر گرایش به یک جسم وارد می شود	کیلوگرم
BMI	*			*				سنجشی آماری برای مقایسه وزن و قد یک فرد	کیلوگرم/مترمربع
گروه ها	*					*		افرادی که در هر یک از دو گروه غیر مبتلا و بیماران مبتلا به سندرم تخمندان پلی کیستیک قرار می گیرند	گروه غیر مبتلا گروه بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی- کیستیک
پلی مورفیسم		*				*		تغییر در دنباله DNA است که در یک نوکلئوتید (G,T,A,C) در ژنوم بین افراد یک گونه بیولوژیکی یا بین یک جفت کروموزوم در یک فرد رخ می دهد	ژنوتیپ

فصل چہارم

نتائج

1-4- نتایج

مشخصات دموگرافیک و بیوشیمیایی افراد در دو گروه مطالعه شامل سن، قد، وزن، شاخص توده بدن، کلسترول توتال، تری گلیسرید، ال دی ال، اچ دی ال، قند خون ناشتا، LH، FSH، پرولاکتین، تستسترون، استرادیول و قند خون 2 ساعت بعد می باشند (جدول 4-1). نتایج این بررسی نشان داد که میانگین سن و BMI در گروه کنترل به ترتیب برابر با $31/53 \pm 6/24$ سال و $26/13 \pm 3/65$ کیلوگرم/مترمربع بوده است و در گروه مبتلایان به PCOS به ترتیب $32/23 \pm 5/44$ سال و $32/47 \pm 4/36$ کیلوگرم/مترمربع به دست آمد. عدم تفاوت معنادار سن در دو گروه نشان داد که تفاوت های گروه های مورد مطالعه تحت تاثیر این متغیر نمی باشد. از سوی دیگر نتایج نشان داد که میزان BMI به طور معناداری از افراد گروه بیمار بیشتر می باشد. اگرچه درمیزان HDL در دو گروه کنترل و PCOS تفاوت معناداری مشاهده نشد. از سوی دیگر میزان تری گلیسرید و LDL نیز در هر دو گروه مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده که این متغیرها PCOS به ترتیب $136/67 \pm 42/7$ و 101.2 ± 7.4 به طور معناداری از گروه کنترل بیشتر می باشد. در مورد کلسترول نیز این ارتباط معنی دار بود و در گروه بیمار میزان کلسترول پایینتر از گروه کنترل بود.

بررسی میزان هورمون ها نشان داد که میزان تسترون در افراد مبتلا به PCOS ($63/99 \pm 35/29$) در مقایسه با افراد گروه کنترل ($52/64 \pm 40/73$) به طور معناداری بیشتر می باشد ($P\text{-value}=0.026$). از سوی دیگر نشان داده شد که میزان استرادیول در گروه کنترل به طور معناداری از مبتلایان به PCOS بیشتر می باشد ($P\text{-value}=0.008$).

در بررسی میزان قند خون ناشتا اگرچه اختلافی بین دو گروه مورد بررسی مشاهده نشد ($P\text{-value}=0.549$) اما میزان گلوکز خون پس از 2 ساعت به طور معناداری در افراد سالم بیشتر از گروه PCOS سالم بوده است ($P\text{-value}=0.032$).

مقایسه خصوصیات دمو گرافیک و بیوشیمیایی در دو گروه کنترل و PCOS

جدول 1-4 مبتلا به

	Case (n=106)	Control (n=114)	p-values	
سن (سال)	32.2 ± 5.4	31.5 ± 6.2	0.377	
BMI(kg/m ²) *	32.5 ± 4.4	26.1 ± 3.6	<0.001	
کلسترول کل (mg/dL)	177.5 ± 13.5	199.4 ± 24.9	<0.001	
تری گلسیرید (mg/dL)	136.7 ± 42.7	114.3 ± 30.9	<0.001	
HDL-C(mg/dL)	40.8 ± 2.8	40.9 ± 2.7	0.906	
LDL-C(mg/dL)	101.2 ± 7.4	99.3 ± 7.6	0.013	
گلوکز ناشتا (mg/dL)	92.1 ± 10.3	94.6 ± 15.1	0.549	
LH (IU/L)	16.4 ± 20.7	15.7 ± 20.4	0.654	
FSH (IU/L)	10.6 ± 5.1	9.6 ± 5.1	0.074	
پرولاکتین (μg/L)	33.3 ± 62.9	45.7 ± 94.8	0.661	
تستسترون (nmol/L)	63.9 ± 35.3	52.5 ± 40.7	0.001	
استرادیول (pg/ml)	80.4 ± 43.3	97.1 ± 48.4	0.019	
قند خون 2 ساعت بعد (mg/dL)	142 ± 15.5	150.1 ± 23.9	0.032	

همچنین طی این مطالعه پراکنگی ژنوتیپی GC,GG و CC در پلی مورفیسم 174 (G/C) - پروموتور ژن

IL6 در بیماران مبتلا به PCOS و گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت (P-value=0.01). نتایج این مطالعه

نشان دهنده اختلاف معنادار در فراوانی ژنوتیپ‌های موجود منتج از پلی مورفیسم 174(G/C) - پروموتور

ژن IL6 در گروه کنترل و مورد بود.

جدول 2-4 مقایسه پراکندگی ژنوتیپی در پروموتور ژن IL6منتج شده

از پلی مورفیسم 174 (G/C) در دو گروه مورد مطالعه

کل	کنترل	مورد	
103 (46.8%)	47 (41.2%)	56 (52.8%)	GG
67 (30.5%)	45 (39.5%)	22 (20.8%)	CC
(22.7%)	22 (19.3%)	28 (26.4%)	G/C
220	114	106	Total
سطح معنا داری $P=0.01$			

سطح معنا داری = آزمون کای دو

جدول 3-4 نشان دهنده نتیجه بررسی Logistic regression بین ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم در پروموتور ژن IL6 می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که بین ژنوتیپ‌های GC و CC اختلاف معناداری وجود دارد ($P\text{-value}=0.006$). همچنین این بررسی بین ژنوتیپ‌های CC و GG نیز اختلافی معنادار نشان داد ($P\text{-value}=0.01$).

	OR	95%CI	p-value
CC (GG)	0.41	0.08-0.66	0.006
C/G (GG)	1.1	0.73-1.7	0.44

مشخصات دموگرافیک و بیوشیمیایی بین ژنوتیپ‌های CC، GC، و GG در پلی مورفیسم (G/C) 174- در پروموتور ژن IL6 در گروه کنترل مورد بررسی آماری قرار گرفت (جدول 4-4). نتایج این بررسی آماری نشان داد که میزان کلسترول کل در گروه‌های سه گانه ژنوتیپی تفاوت معنادار داشته است ($P\text{-value}=0.020$). نتایج نشان داد که سطح کلسترول کل در گروه ژنوتیپ CC برابر با 98.4 ± 6.4 بوده است که میزان آن از دیگر ژنوتیپ‌ها کمتر می‌باشد. جدول 4-1

جدول 4-2 مقایسه پارامترهای دموگرافیک و بیوشیمیایی بین گروه های ژنوتیپی مرتبط با پلی مورفیسم (G/C) 174- در گروه کنترل

*سطح معناداری	G/C (n=50)	CC (n=67)	GG (n=103)	-174(G/C)
0.627	32.5 ± 5.9	31.9 ± 6	31.5 ± 5.8	سن(سال)
0.749	29.4 ± 4.5	28.8 ± 5	29.4 ± 5.5	BMI(kg/m ²) *
0.236	186.9 ± 24.9	186.5 ± 20.6	191.3 ± 23.4	کلسترول کل (mg/dL)
0.703	120.9 ± 36.1	126.6 ± 39.4	126.2 ± 39.6	تری گلیسیرید (mg/dL)
0.192	40.3 ± 2.5	40.5 ± 2.2	41.3 ± 3.1	HDL-C(mg/dL)
0.018	100.3 ± 6.5	98.4 ± 6.4	101.3 ± 8.5	LDL-C(mg/dL)
0.355	91 ± 10.7	93.2 ± 14.5	94.7 ± 13	گلوکز ناشتا (mg/dL)
0.155	12.1 ± 16	17.5 ± 21.7	17.1 ± 21.5	LH (IU/L)
0.741	9.6 ± 4.3	9.9 ± 5.4	10.4 ± 5.3	FSH (IU/L)
0.390	37.8 ± 79.4	46.2 ± 97.2	36.5 ± 70.2	پرولاکتین (μg/L)
0.665	63.1 ± 42.2	57.5 ± 41	55.8 ± 35.1	تستسترون(nmol/L)
0.535	85.2 ± 45.9	94.5 ± 51.1	87.3 ± 44.1	استرادیول (pg/ml)
0.874	143.5 ± 15.1	145.4 ± 20.9	148 ± 22.7	قند خون دو ساعته(mg/dl)

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده اند

* آزمون تی مستقل

همچنین مشخصات دموگرافیک و بیوشیمیایی بین ژنوتیپ‌های GC، CC، و GG در پلی‌مورفیسم -174-(G/C) در پروموتور ژن IL6 در گروه بیماران مبتلا به PCOS نیز مورد بررسی آماری قرار گرفت (جدول 4-5) نتایج این بررسی نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح LDL (P-value=0.018) وجود داشت. به طوری که بیشترین (101.3± 8/5) و کمترین (98.4 ± 6/4) سطح LDL به ترتیب در ژنوتیپ‌های CC,GG مشاهده شد (p-value=0.018)

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

1-5- بحث

سندرم تخمدان پلی کیستیک یا نشانگان تخمدان پر کیستی شایع ترین اختلالات غدد درون ریز (آندوکرینوپاتی) در زنان و شایع ترین علت نازایی ناشی از عدم تخمک گذاری می باشد. نامگذاری این سندرم به دلیل وجود تخمدان های بزرگ محتوی تعداد زیادی کیست کوچک (در اغلب زنان مبتلا و نه در همه) است که در لایه بیرونی هر تخمدان قرار گرفته است (5, 8).

زنان مبتلا به این بیماری علایم شایعی مانند اختلالات قاعدگی (به خصوص خون رزش گاهگاهی (الیگومنوره))، علایم هیپراندروژنیسم مانند پرمویی (هیرسوتیسم) و آکنه، ریزش مو و نازایی دارند. بیماران در معرض عوارض جدی مانند افزایش خطر سرطان آندومتر و پستان، دیس لیپیدمی، هیپرتانسیون، بیماری های قلبی و عروقی و دیابت می باشند. شیوع چاقی و دیس لیپیدمی در مبتلایان به PCOS بیشتر از زنان سالم می باشد. ۴۰ درصد زنان مبتلا، دچار چاقی مفرط و ۷۵ درصدشان نازا می باشند (7, 10).

این بیماری تقریباً در ۶ تا ۱۰ درصد همه زنانی که در سنین باروری می باشند دیده می شود. علت بیماری مزبور مشخص نیست اما محققان بر این باورند که عوامل ارثی و دیابت در ظهور آن نقش دارند. قاعدگی های نامنظم، رشد موهای زاید، جوش های پوستی (آکنه) و چاقی در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک مشاهده می شود. این عارضه می تواند در نوجوانی با دوره های قاعدگی نامنظم مشخص گردد یا اینکه بعدها به دنبال افزایش وزن یا مشکل در باروری تشخیص داده شود (8).

علت دقیق سندرم تخمدان پلی کیستیک هنوز ناشناخته است. زنان مبتلا ممکن است به دلیل مشکلات بوجود آمده در تخمک گذاری، برای باردار شدن با مشکل مواجه شوند. تشخیص زود هنگام و شروع درمان می تواند به پیشگیری عوارض طولانی مدت آن مثل دیابت نوع ۲، بیماری های قلبی و سکتة کمک کند.

شواهد سونوگرافی تخمدان پلی کیستیک (افزایش حجم تخمدان به بیش از ۹ میلی لیتر، وجود کیست‌های ۲-۸ میلی متری به تعداد ۱۰ و یا بیشتر در هر تخمدان و افزایش دانسیته استرومای رحم (هایپرپلازی آندومتر)) هستند (62). اختلالات متابولیکی از جمله افزایش سطح سرمی هورمون‌های LH، تستوسترون، انسولین، پرولاکتین و مقاومت به انسولین در این بیماری شایع است. درمان با کلومیفن، قرص‌های خوراکی ضد بارداری، گنادوتروپین‌ها آگونیست‌های GnRH، مصرف همزمان کلیم و ویتامین D و رژیم لاغری می‌باشد. در موارد مقاوم لاپاراسکوپی انجام می‌شود. مقاومت به انسولین به عنوان یک فاکتور اصلی در پاتوژنز PCOS می‌باشد از این رو به صورت گسترده از داروهای پایین‌آورنده انسولین مانند متفورمین در درمان این نشانگان استفاده می‌شود (8).

تست اختصاصی‌ای برای تشخیص قطعی سندرم تخمدان پلی کیستیک وجود ندارد. تشخیص بر مبنای رد موارد دیگر است. یعنی پزشک تمامی علائم و نشانه‌ها را بررسی کرده و سپس سایر احتمالات را رد می‌کند. در طی این پروسه، پزشک بسیاری از عوامل را در نظر می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به سابقه پزشکی، معاینه قد، وزن و فشار خون و علاوه بر آن معاینات لگنی، آزمایش خون برای بررسی سطح بعضی از هورمون‌ها برای تعیین علت اختلالات در قاعدگی یا آندروژن بالا، تست کلسترول و تری گلیسرید ناشتا و تست تحمل گلوکز اشاره کرد. سونوگرافی لگنی نیز می‌تواند ظاهر تخمدان‌ها و ضخامت دیواره رحم را نشان دهد (63).

چندریختی تک-نوکلئوتید به طور مخفف SNP که اسنپ خوانده می‌شود یک تغییر در دنباله ی DNA است که در یک نوکلئوتید A، T، G و C در ژنوم بین افراد یک گونه بیولوژیکی یا بین یک جفت کروموزوم در یک فرد این نوکلئوتید فرق دارد. در یک جمعیت، میتوان یک فرکانس ال حداقل Minor allele frequency به اسنپ ها نسبت داد. کمترین فرکانس ال در یک لوکوس که در یک جمعیت خاصی

مشاهده شده است. به سادگی این کمتر از فرکانس دو آلل برای چندریختی تک-نوکلئوتیدی است. بین جمعیت انسان‌ها تفاوت‌های گوناگونی است، بنابراین یک اسنپ آلل که در یک منطقه جغرافیایی یا گروه نژادی مشترک است، ممکن است بین دیگر گونه‌ها کمتر باشد.

چند ریختی تک نوکلئوتید ممکن است بین یک از دسته‌های زیر اتفاق بیافتد. دنباله کد در ژن‌ها، مناطق غیر کد در ژن‌ها، یا در مناطق بین ژنی در بین ژن‌ها. اسنپ‌ها درون یک دنباله کد لزوماً دنباله آمینواسید از پروتئینی که تولید شده است را تغییر نمی‌دهد و این به دلیل تباہیدگی کد ژنتیکی می‌باشد.

اسنپیی که در آن هر دوی آلل‌ها یک دنباله یکسان از پلی‌پپتید را تولید می‌کنند، یک چند ریختی مترادف^۱ نامیده می‌شود. اگر یک دنباله پلی‌پپتید متفاوت تولید شود به آن چندریختی جایگذاری^۲ می‌گویند. یک چندریختی جایگذاری می‌تواند missense باشد که در آن صورت منجر به آمینواسید متفاوتی خواهد شد، یا اینکه می‌تواند nonsense باشد که در این صورت منجر به یک توقف کدون زودرس^۳ می‌شود. بیشتر از نصف امراض جهش به علت چندریختی‌های جایگذاری هستند (53).

اسنپ‌هایی که در ناحیه کد پروتئین نیستند ممکن است همچنان روی تکه کردن و نسخه برداری ژن تاثیر بگذارند. بیان‌هایی از ژن که از این نوع اسنپ تاثیر پذیرفته باشند eSNP (expression SNP) نامیده می‌شوند (53).

با توجه به اهمیت سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در جمعیت ایرانی و نقش اسنپ‌ها در بیماری‌های مختلف در این مطالعه ارتباط بین پلی مورفیسم (G/C) 174- ژن IL6 که در بعضی مطالعات در جمعیت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است در جمعیت بیماران PCO ایرانی مورد بررسی قرار گرفته است.

¹ Synonymous Polymorphism

² Replacement Polymorphism

³ Premature Stop Codon

نتایج این مطالعه نشان داد که در متغیرهای BMI، کلسترول کل، و تری‌گلیسرید، LDL، 2HPP در دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به PCOS تفاوت معنادار داشته‌اند به طوریکه میزان LDL، TG، BMI و سن در گروه بیمار بالاتر بود. همچنین نشان داده شد که میزان هورمون‌های تستسترون و استرادیول نیز در این گروه‌ها تفاوت معنادار داشته است. بطوریکه میزان تستسترون در گروه مورد بیشتر از گروه کنترل بوده است و در ارتباط با هورمون استرادیول این تفاوت برعکس بوده است. نتیجه بررسی میزان گلوکز پس از 2 ساعت نیز نشان داد که میزان آن در افراد مبتلا به PCOS به طور معناداری کمتر از گروه کنترل می‌باشد.

نتایج بررسی فراوانی ژنوتیپی حاصل از پلی‌مورفیسم (G/C)-174 در پروموتور ژن IL6 نیز نشان دهنده تفاوت معنادار این ژنوتیپ‌ها در گروه کنترل و مورد بود. بطوریکه فراوانی ژنوتیپ‌های CC، GG، GC در گروه کنترل به ترتیب برابر با 3/19، 2/41، و 5/39 بود و این فراوانی در گروه مبتلایان به PCOS به ترتیب برابر با 4/26، 8/52، و 8/20 به دست آمد. همچنین بررسی فراوانی هریک از ژنوتیپ‌های مذکور فارغ از گروه بندی کنترل و مورد نیز نشان داد که بین میزان فراوانی ژنوتیپ‌های GC و CC همچنین بین ژنوتیپ‌های CC و GG اختلاف معناداری وجود دارد.

از سوی دیگر میزان فراوانی متغیرهای دموگرافیک و بیوشیمیایی در برابر هر یک از ژنوتیپ‌ای اسنپ - (G/C) 174 در گروه کنترل و بیماران مبتلا به PCOS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که در گروه کنترل تنها سطح کلسترول کل با ژنوتیپ‌های CG، GG و CC در ارتباط بوده است. بر اساس این بررسی نشان داده شد بیشترین ($101/3 \pm 8/5$) و کمترین ($98/4 \pm 6/4$) سطح کلسترول گروه کنترل به ترتیب در افراد با ژنوتیپ GG و CC بوده است.

در سال 2015 نیز Hazwanie و همکارانش به بررسی فراوانی چند پلی‌مورفیسم متفاوت در جمعیت زنان مالزیایی مبتلا به PCOS پرداختند (64). طی این مطالعه تعداد 12 زن مبتلا به PCOS و 145 زن سالم به

عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی افراد بیمار و افراد سالم در جامعه مالزی به ترتیب برابر با $28/0 \pm 3/2$ و $21/6 \pm 3/6$ سال بود. در مقایسه با نتایج مطالعه حال حاضر به نظر می‌رسد که سن تشخیص بیماری PCOS در جامعه ایرانی بیشتر می‌باشد. مشابه با نتایج به دست آمده از این مطالعه، Hazwanie و همکارانش نشان دادند که میزان BMI در افراد مبتلا به PCOS به طور معناداری از افراد سالم بالاتر می‌باشد. این گروه اعلام کردند که میزان این متغیر در افراد بیمار و سالم به ترتیب برابر با $29/2 \pm 5/0$ و $24/1 \pm 4/0$ می‌باشد.

5-2- نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و مقایسه آن با نتایج دیگر مطالعات باید گفت که جهش- $174(G/C)$ در ژن IL6 نقش مهمی در بروز PCO داشته (39.5% در گروه مورد در مقابل 20.8% در گروه کنترل).

نتایج این مطالعه نشان داد که در متغیرهای BMI، کلسترول کل، و تری‌گلیسرید، LDL، 2HPP در دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به PCOS تفاوت معنادار داشته‌اند به طوری که میزان BMI، LDL، TG، و سن در گروه بیمار بالاتر بود. همچنین نشان داده شد که میزان هورمون‌های تستسترون و استرادیول نیز در این گروه‌ها تفاوت معنادار داشته است. بطوریکه میزان تستسترون در گروه مورد بیشتر از گروه کنترل بوده است و در ارتباط با هورمون استرادیول این تفاوت برعکس بوده است. نتیجه بررسی میزان گلوکز پس از 2 ساعت نیز نشان داد که میزان آن در افراد مبتلا به PCOS به طور معناداری کمتر از گروه کنترل می‌باشد. در مورد کلسترول نیز این ارتباط معنی دار بود و در گروه بیمار میزان کلسترول پایینتر از گروه کنترل بود.

نتایج بررسی فراوانی ژنوتیپی حاصل از پلی‌مورفیسم $174(G/C)$ در پروموتور ژن IL6 نیز نشان دهنده تفاوت معنادار این ژنوتیپ‌ها در گروه کنترل و مورد بود. بطوریکه فراوانی ژنوتیپ‌های CC, GG, GC در گروه کنترل به ترتیب برابر با $19/3\%$ ، $41/2\%$ ، و $39/5\%$ بود و این فراوانی در گروه مبتلایان به PCOS به ترتیب برابر با $26/4\%$ ، $52/8\%$ ، و $20/8\%$ به دست آمد. همچنین بررسی فراوانی هریک از ژنوتیپ‌های مذکور فارغ از گروه بندی کنترل و مورد نیز نشان داد که بین

میزان فراوانی ژنوتیپ‌های GC و CC همچنین بین ژنوتیپ‌های CC و GG اختلاف معناداری وجود دارد.

از سوی دیگر میزان فراوانی متغیرهای دموگرافیک و بیوشیمیایی در هر یک از ژنوتیپ‌های اسنیپ (G/C) 174- در گروه کنترل و بیماران مبتلا به PCOS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که تنها سطح کلسترول کل با ژنوتیپ‌های CG، GG و CC در ارتباط بوده است. بر اساس این از بررسی نشان داده شد بیشترین ($101/3 \pm 8/5$) و کمترین ($98/4 \pm 6/4$) سطح کلسترول به ترتیب در افراد با ژنوتیپ GG و CC بوده است.

3-5- پیشنهادات

پیشنهاد می‌شود که این مطالعه در جمعیت بزرگتر و متنوع تری از کشور ایران با توجه به تنوع قومی و نژادی این کشور انجام بگیرد و در کل جمعیت ایران و به صورت بررسی تک تک نژادهای ایرانی صورت پذیرد.

- .1 Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(12):1223-36.
- .2 Urbanek M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 2007;3(2):103-11.
- .3 Elizabeth M, Leslie NS ,Critch EA. Managing polycystic ovary syndrome: a cognitive behavioral strategy. *Nursing for women's health*. 2009;13(4):292-300.
- .4 Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology*. 2004;60(117.-1:(
- .5 Tehrani FR, Behboudi-Gandevani S. Polycystic ovary syndrome. *Contemporary Gynecologic Practice: InTech*; 2015.
- .6 Barber TM, Franks S. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Polycystic Ovary Syndrome*. 40: Karger Publishers; 2013. p. 28-39.
- .7 Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertility and sterility*. 2003;80(1):123-7.
- .8 Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2008;22(2):261-74.
- .9 Tarlatzis B, Fauser BC, Legro R, Norman R, Hoeger K, Pasquali R, et al. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2008;23(3):462-77.
- .10 Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H. Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clinical endocrinology*. 2000;52(5):595-600.
- .11 Glueck C, Wang P, Kobayashi S, Phillips H, Sieve-Smith L. Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2002;77(3):520-5.
- .12 Glueck C, Goldenberg N, Pranikoff J, Loftsring M, Sieve L, Wang P. Height, weight, and motor-social development during the first 18 months of life in 126 infants born to 109 mothers with polycystic ovary syndrome who conceived on and continued metformin through pregnancy. *Human Reproduction*. 2004;19(6):1323-30.
- .13 Hollinrake E, Abreu A, Maifeld M, Van Voorhis BJ, Dokras A. Increased risk of depressive disorders in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2007;87(6):1369-76.
- .14 Goodarzi MO, Dumesic DA ,Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011;7(4):219-31.

- .15 Ehrman DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocrine Reviews*. 1995;16(3):322-53.
- .16 Norman RJ, Davies MJ, Lord J, Moran LJ. The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2002;13(6):251-7.
- .17 Escobar-Morreale HcF, Calvo RM, Sancho J, San Millán JL. TNF- α and hyperandrogenism: a clinical, biochemical, and molecular genetic study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(8):3761-7.
- .18 Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, et al. Tumour necrosis factor α converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002;51(1):37-43.
- .19 Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
- .20 Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*. 2010;68(10):930-41.
- .21 Victor F, Gottlieb A. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *Journal of drugs in dermatology: JDD*. 2002;1(3):264-75.
- .22 Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic acids research*. 1985;13(17):6361-73.
- .23 Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385(6618):729.
- .24 Tang P, Hung M-C, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*. 1996;35(25):8216-25.
- .25 Deshpande RR, Chapman JC, Michael SD, Chang MDY. Alteration of cytokine production in follicular cystic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2000;44(2):80-8.
- .26 Sukhikh G, Vanko L. Interrelationships between Immune and Reproductive Systems in Human. *Russian journal of immunology: RJI: official journal of Russian Society of Immunology*. 1999;4(4):312-4.
- .27 Bischoff FZ, Simpson JL. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Human reproduction update*. 2000;6(1):37-44.
- .28 Vgontzas AN, Trakada G, Bixler EO, Lin HM, Pejovic S, Zoumakis E, et al. Plasma interleukin 6 levels are elevated in polycystic ovary syndrome independently of obesity or sleep apnea. *Metabolism*. 2006;55:1076-82.

- .29 Wieser F, Fabjani G, Tempfer C, Schneeberger C, Zeillinger R, Huber JC, et al. Tumor necrosis factor- α promotor polymorphisms and endometriosis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002;9(5):313-8.
- .30 Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998;102:1369-76
- .31 . Erdogan M, Karadeniz M, Berdeli A, Tamsel S, Yilmaz C. The relationship of the interleukin-6-174 G > C gene polymorphism with cardiovascular risk factors in Turkish polycystic ovary syndrome patients. *Int J Immunogenet*. 2009;36:283-8.
- .32 Hart R, Hickey M, Franks S. Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2004;18(5):671-83.
- .33 Battaglia C, Mancini F, Persico N, Zaccaria V, de Aloysio D. Ultrasound evaluation of PCO, PCOS and OHSS. *Reproductive biomedicine online*. 2004;9(6):614-9.
- .34 Marshall JC, Eagleson CA. Neuroendocrine aspects of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1999;28(2):295-324.
- .35 Park K, Kim J, Ahn C, Song Y, Lim S, Lee H. Polycystic ovarian syndrome (PCOS) and insulin resistance. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2001;74(3):261-7.
- .36 Rotterdam E ,Group A-SPCW. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction (Oxford, England)*. 2004;19(1):41.
- .37 Baptiste CG, Battista M-C, Trottier A, Baillargeon J-P. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;122(1):42-52.
- .38 Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *International journal of obesity*. 2002;26(7):883.
- .39 Ando T, Ichimaru Y, Konjiki F, Shoji M, Komaki G. Variations in the preproghrelin gene correlate with higher body mass index, fat mass, and body dissatisfaction in young Japanese women. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(1):25-32.
- .40 Diamanti-Kandarakis E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *Human Reproduction Update*. 2005;11(6):631-43.
- .41 Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V, Heiman ML, Tschöp M, Pasquali R. Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: correlation with insulin resistance and androgen levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(12):5625-9.
- .42 Panidis D, Farmakiotis D, Koliakos G, Rousso D, Kourtis A, Katsikis I, et al. Comparative study of plasma ghrelin levels in women with polycystic ovary syndrome, in hyperandrogenic women and in normal controls. *Human Reproduction*. 2005;20(8):2127-32.

- .43 Choi HJ, Cho YM, Moon MK, Choi HH, Shin HD, Jang HC, et al. Polymorphisms in the ghrelin gene are associated with serum high-density lipoprotein cholesterol level and not with type 2 diabetes mellitus in Koreans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(11):4657-63.
- .44 Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine reviews*. 1997;18(6):774-800.
- .45 Gambineri A, Pagotto U, Tschöp M, Vicennati V, Manicardi E, Carcello A, et al. Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *Journal of endocrinological investigation*. 2003;26(7):629-34.
- .46 Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 2003;(9)3;
- .47 Walch K, Grimm C, Zeillinger R, Huber JC, Nagele F, Hefler LA. A common interleukin-6 gene promoter polymorphism influences the clinical characteristics of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81:1638–41.
- .48 Vural P, Degirmencioglu S, Saral NY, Akgul C. Tumor necrosis factor alpha (–308), interleukin-6 (–174) and interleukin-10 (–1082) gene polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;150:61–5.
- .49 Tumu VR, Govatati S, Guruvaiah P, Deenadayal M, Shivaji S, Bhanoori M. An interleukin-6 gene promoter polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome in South Indian women. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30:1541–6.
- .50 . Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010 Oct;122(1-3):42-52.
- .51 Hodgkinson A, Eyre-Walker A. Human triallelic sites: evidence for a new mutational mechanism? *Genetics*. 2010;184(1):233-41.
- .52 Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clinical genetics*. 2000;58(4):250-64.
- .53 Kwok P-Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001;2(1):235-58.
- .54 Nachman MW. Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. *TRENDS in Genetics*. 2001;17(9):481-5.
- .55 Brumfield RT, Beerli P ,Nickerson DA, Edwards SV. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution*. 2003;18(5):249-56.

- .56 Thomas PE, Klinger R, Furlong LI, Hofmann-Apitius M, Friedrich CM. Challenges in the association of human single nucleotide polymorphism mentions with unique database identifiers. *BMC bioinformatics*. 2011;12(4):S4.
- .57 Kidd KK, Pakstis AJ, Speed WC, Grigorenko EL, Kajuna SL, Karoma NJ, et al. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic science international*. 2006;164(1):20-32.
- .58 Fareed M, Afzal M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: a tool for broad spectrum service. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2013;134.-123:(2)4
- .59 Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928-33.
- .60 Lakshmi KV, Shetty P, Vottam K, Govindhan S, Ahmad SN, Hasan Q. Tumor necrosis factor alpha-C850T polymorphism is significantly associated with endometriosis in Asian Indian women. *Fertility and sterility*. 2010;94(2):453-6.
- .61 Stonek F, Hafner E, Metzenbauer M, Katharina S, Stümpflen I, Schneeberger C, et al. Absence of an association of tumor necrosis factor (TNF)-alpha G308A, interleukin-6 (IL-6) G174C and interleukin-10 (IL-10) G1082A polymorphism in women with preeclampsia. *Journal of reproductive immunology*. 2008;77(1):85-90.
- .62 Silfen ME, Denburg MR, Manibo AM, Lobo RA, Jaffe R, Ferin M, et al. Early endocrine, metabolic, and sonographic characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS): comparison between nonobese and obese adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(10):4682-8.
- .63 Chang WY, Knochenhauer ES, Bartolucci AA, Azziz R. Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. *Fertility and sterility*. 2005;8323.-1717:(6)
- .64 Hazwanie H, Gan S, Nalliah S. The Relevance of Genetic Polymorphism of CYP1A1, ICAM-1, TNF- α and INSR Genes in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Journal of Medical and Bioengineering Vol*. 2015;4.(5)
- .65 Deepika M, Reddy KR, Yashwanth A, Rani VU, Latha KP, Jahan P. TNF- α haplotype association with polycystic ovary syndrome—a South Indian study. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(11):1493-503.
- .66 Diao X, Han T, Zhang Y, Ma J, Shi Y, Chen Z-J. Family association study between tumour necrosis factor a gene polymorphisms and polycystic ovary syndrome in Han Chinese. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(5):581-7.

Abstract

Background:.....

Methods: This descriptive-analytic study contained 152 PCOS patients and 164 healthy women which are divided into 2 groups. 5 cc blood sample has collected from each patient for biochemical characterization such as fasting blood glucose, triglyceride, HDL, LDL, LH, FSH, testosterone, estradiol, and 2 hours' glucose. These blood samples are also used for genotypic evaluation and allele determination. The frequency of -174 (G/C) single-nucleotide polymorphism (SNP) of IL6gene promoter was investigated by PCR-RFLP technique. SPSS ver. 24 was used for data analysis.

Results: The results of this study showed that BMI, total cholesterol, triglyceride, testosterone, and 2 hours' glucose in PCOS patients were significantly higher than control group. On the other hand, estradiol level in control group is significantly higher than PCOS patients. the cholesterol level in CC genotype of healthy persons is significantly higher than GCand GGgenotypes. Meanwhile, the level of triglyceride and HDL in the PCOS patients withGG genotype are significantly higher than other genotypes.

Conclusion: It can be concluded that -174 (G/C) polymorphism of IL6promoter has protective effect on PCOS

Keywords: Polycystic ovarian syndrome (PCOS), Single nucleotide polymorphism (SNP), Gene, IL6



Qazvin University of Medical Sciences

School of Medicine

Dissertation for the Degree of Specialist in Gyencology

Title

Assessment the Relationship between -174 (G/C) Single Nucleotide Polymorphisms from IL6Gene with Polycystic Ovarian Syndrome

Supervisor:

Dr. Mehdi Sahmani

Dr. Talat Dabagh

Advisor:

Dr. Farshad Foroughi

Student:

Dr.bandranikeh ammari

Publication:

2018